

Aus dem Zentrum für klinische Tiermedizin der Tierärztlichen Fakultät der
Ludwigs-Maximilians-Universität München

Angefertigt unter der Leitung von
Prof. Dr. Joachim Braun

Selektion feliner Oozyten für die IVF mittels Brillantcresylblau-Färbung

Inaugural-Dissertation
zur
Erlangung der tiermedizinischen Doktorwürde
der Tierärztlichen Fakultät
der Ludwigs-Maximilians-Universität München

von
Petra Blencke
aus Gräfelfing

München 2011

Gedruckt mit Genehmigung der Tierärztlichen Fakultät
der Ludwig-Maximilians-Universität München

Dekan: Univ.-Prof. Dr. Braun

Berichterstatter: Univ.-Prof. Dr. Braun

Korreferent/en: Univ.-Prof. Dr. Dr. Dr. habil. Sinowatz

Tag der Promotion: 12. Februar 2011

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	5
2. Literatur	6
2.1. Zyklus der Katze	6
2.2. Follikel- und Eizellentwicklung	7
2.3. Entwicklungskompetenz von Eizellen	9
2.4. Beurteilung der Entwicklungskompetenz	13
2.4.1. Morphologie	13
2.4.2. Grundlage der Brillantcresylblau-Färbung (BCB)	15
2.4.3. Weitere Kriterien	17
2.5. In-vitro-Produktion von felineen Embryonen	17
2.5.1. Gewinnung von Eizellen	17
2.5.2. Medien und Zusätze für die In-vitro-Maturation (IVM)	18
2.5.3. Brutschrankbedingungen	19
2.5.4. Reifungsdauer	20
2.5.5. In-vitro-Fertilisation (IVF)	20
2.5.6. In-vitro-Kultivierung (IVC)	22
3. Material und Methoden	24
3.1. Versuchsaufbau	24
3.1.1. Erster Versuchsabschnitt und Selektion felineer Oozyten mittels BCB-Färbung	24
3.1.2. Zweiter Versuchsabschnitt: Einfluss des Alters der Spenderkatze auf das Ergebnis der IVP	24
3.2. Herkunft des Probematerials	26
3.3. Gewinnung der Oozyten	27
3.4. BCB-Färbung (Versuch 1)	29
3.5. In-vitro-Maturation (IVM)	31
3.6. IVF und Aufbereitung der Spermien	32
3.6.1. Gewinnung der Spermien	32
3.6.2. Kryokonservierung der Spermien	33
3.6.3. Swim up	33
3.6.4. Co-Kultivierung	34
3.7. IVC	34

3.8.	Beurteilung der Teilungs- und Blastozystenrate	35
3.9.	Statistische Auswertung	35
4.	Ergebnisse	36
4.1.	Einfluss der Selektion mit BCB	36
4.1.1.	Anteil BCB+ BCB- Oozyten	36
4.1.2.	Teilungsrate	36
4.1.3.	Blastozystenrate	37
4.2.	Einfluss des Alters der Spenderkatzen auf die IVP	39
4.2.1.	Anteil der COK-Klassen innerhalb einer Altersgruppe	39
4.2.2.	Vergleich der Altersgruppen ohne Berücksichtigung der COK-Klassen	40
4.2.3.	Vergleich der Altersgruppen mit Berücksichtigung der COK-Klassen	41
4.3.	Einfluss der verschiedenen COK-Klassen	43
4.3.1.	Anteil der verschiedenen COK-Klassen	44
4.3.2.	Teilungsrate in den verschiedenen COK-Klassen	44
4.3.3.	Blastozystenraten in den verschiedenen COK-Klassen	45
5.	Diskussion	46
6.	Zusammenfassung	54
7.	Summary	56
8.	Anhang	58
8.1	Verwendete Medien und Färbelösungen	58
9.	Literaturverzeichnis	64

Abkürzungsverzeichnis

ATP	Adenosintriphosphat
BCB	Brillantcresylblau
CL	Corpus luteum
COK	Cumulus-Oozytzen-Komplex
FSH	follikelstimulierendes Hormon
GSH	Glutathion
G6PDH	Glucose-6-Phosphat-Dehydrogenase
GV	Germinalvesikel
GVBD	germinal vesicle breakdown
ICSI	Intrazytoplasmatische Spermieninjektion
IETS	International Embryo Transfer Society
IGF	Insuline-like growth factor
IGFBPs	Insuline-like growth factor Bindungsprotein
IK	Inkubationskontrolle
IVC	In-vitro-Kultivierung
IVF	In-vitro-Fertilisation
IVM	In-vitro-Maturation
LH	luteinisierendes Hormon
MAP	mitogen activated protein
NADPH	Nicotinamidadenindinukleotidphosphat
OMI	Oocyte maturation Inhibitor
PDE	Phosphodiesterase
ROS	Reactive oxidative species
SOF	Synthetic oviductal fluid
TCM	Tissue Culture Medium

Abbildungsverzeichnis

Abb. 1	Mechanismus der Brillantcresylblau-Färbung	16
Abb. 2	Schematische Darstellung des ersten Versuchsabschnittes	25
Abb. 3	Schematische Darstellung des zweiten Versuchsabschnittes	26
Abb. 4	Katzenovar	27
Abb. 5	Slicing eines Katzenovars	28
Abb. 6	COK der Klassen I bis III	29
Abb. 7	COK der Klasse IV	29
Abb. 8	Versuchsaufbau der BCB-Färbung	30
Abb. 9	Darstellung BCB+ und BCB-	31
Abb.10	Embryo mit zwei Blastomeren	35
Abb.11	Blastozyste Tag 8	35
Abb.12	Teilungsrate des ersten Versuchsabschnittes	36
Abb.13	Blastozystenrate des ersten Versuchsabschnittes	38
Abb.14	Blastozystenrate/geteilte Eizellen des ersten Versuchsabschnittes	38
Abb.15	Anteil der verschiedenen COK-Klassen innerhalb einer Altersgruppe	40
Abb.16	Teilungsraten in den Altersgruppen	40
Abb.17	Blastozystenraten in den Altersgruppen bezogen auf die Gesamtzahl und geteilten Oozyten	41
Abb.18	Teilungsraten der COK-Klassen innerhalb der Altersgruppen	42
Abb.19	Teilungsraten der Altersgruppen innerhalb der COK-Klassen	43
Abb.20	Verteilung der COK-Klassen	44
Abb.21	Teilungsrate in den verschiedenen COK-Klassen	45

Tabellenverzeichnis

Tab.1	Klassifizierung der Eizellen nach Wood und Wildt	28
Tab.2	Blastozystenrate in den verschiedenen COK-Klassen	45

1. Einleitung

Bei der Hauskatze wurde 1989 erstmals eine Studie über die In vitro Maturation (IVM) von Oozyten durchgeführt (Johnston et al. 1989). Inzwischen wurden sowohl bei den Haus- als auch bei den Wildkatzen die Techniken der In vitro Maturation (IVM), der In vitro Fertilisation (IVF) und die In vitro Kultivierung (IVC) von Embryonen weiterentwickelt, ebenso die Kryokonservierung von Embryonen und der Embryotransfer.

Mittlerweile konnte wiederholt nachgewiesen werden, dass diese Techniken auch bei Wildkatzen angewendet werden können. Damit stehen neue Instrumente zur Verfügung, die bei Programmen zur Erhaltung gefährdeter Tierarten eingesetzt werden können.

In dieser Arbeit sollte ein Verfahren zur Selektion von Eizellen geprüft werden, mit dem deren Entwicklungskompetenz schon vor der IVM beurteilt werden kann. Das Enzym Glucose-6-Phosphat-Dehydrogenase (G6PDH) ist in wachsenden Eizellen aktiv, die noch keine volle Entwicklungskompetenz besitzen, nicht aber in Eizellen nach Abschluss der Wachstumsphase. Werden Eizellen mit dem Farbstoff Brillantcresylblau behandelt, wird dieser in wachsenden Eizellen durch das aktive Enzym abgebaut. Bei verschiedenen Spezies konnte bereits gezeigt werden, dass mit diesem Verfahren Eizellen mit einer höheren Entwicklungskompetenz selektiert werden können.

2. Literatur

2.1. Zyklus der Katze

Unter natürlichen Lichtverhältnissen ist der Zyklus der Katze saisonal polyöstrisch. Die Pubertät findet in der Regel zwischen dem 6. bis 9. Lebensmonat statt. Dies ist jedoch auch abhängig vom Körpergewicht der Katze. Die erste Östrusphase findet man bei Katzen, die ein Körpergewicht von ca. 2,3 bis 2,5 kg erreicht haben. Katzen haben eine induzierte Ovulation. Die Zyklusdauer beträgt 14 bis 21 Tage (Simpson et al. 1998). Bei der Katze ist eine Unterscheidung von Proöstrus und Östrus anhand klinischer Symptome schwierig. Sie werden deshalb als Phase der Rolligkeit mit einer Dauer von durchschnittlich 3-10 Tagen zusammengefasst. Der Proöstrus dauert 1-4 Tage, der Östrus 2-6 Tage, der Interöstrus (Ruhephase ohne CL) 10-14 Tage und der Anöstrus mehrere Monate (variabel, tritt in den Wintermonaten auf). Der Interöstrus ist die Zeit zwischen zwei Rolligkeiten. Bei der Katze gibt es drei unterschiedliche Zyklusverläufe nach dem Proöstrus und Östrus. Paart sich die Katze während der Rolligkeit nicht und findet keine Ovulation statt, atresieren die Follikel und der nächste Östrus tritt nach 1-2 Wochen ein. Kommt es zu einer Ovulation folgt eine Pseudogravidität von ca. 25-45 Tagen. Danach folgen wieder Zyklen mit Proöstrus und Östrus, auf die im Herbst/Winter die Anöstrusphase folgt. Kommt es nach der Ovulation zur Gravidität (58-63 Tage), folgt eine Laktationsphase von 40-50 Tagen. Darauf folgen wieder Proöstrus, Östrus und Anöstrus (Feldmann und Nelson 1996). Im Proöstrus schmiegt die Katze ihren Kopf und ihren Nacken an Objekte, die sie angenehm findet und zeigt ein anhängliches Verhalten. Sie wird jedoch noch nicht zulassen, dass ein Kater sie deckt. Diese Phase dauert etwa 1-2 Tage und ist so unauffällig, dass sie oft nicht bemerkt wird. Während dieser Phase induziert das follikelstimulierende Hormon (FSH) aus der Hirnanhangsdrüse die ovarische Follikelentwicklung. Im weiteren Verlauf nimmt der Durchmesser der Follikel zu und es kommt zu einem Anstieg von Östradiol, das von den Granulosazellen der Ovarien ausgeschüttet wird. Östradiol beeinflusst die Vaginalschleimhaut und das Verhalten im Östrus (Shille et al. 1979). Im Verlauf des Östrus erreichen drei bis sieben Follikel das Stadium des dominanten Follikels, während andere Follikel in der Entwicklung atresieren (Feldmann und Nelson 1996). In dieser Phase zeigt die Katze ihr „rolliges“ Verhalten, sie schreit, nimmt eine Kauerstellung ein und zeigt sich anhänglich. Eine Einteilung des ovarischen Zyklus der Katze kann im

Rahmen der assistierten Reproduktion anhand des Funktionszustandes der Ovarien beschrieben werden. Als „follikulär“ werden Ovarien mit mindestens einem sichtbaren Follikel mit einem Durchmesser von mehr als 2 mm bezeichnet und als „luteal“ Ovarien mit mindestens einem Corpus luteum. Beim Vorliegen von einem oder mehreren Corpora lutea wird das Ovar als „frisch ovuliert“ klassifiziert. Unter die Einteilung „intermediär“ fallen Ovarien mit Follikeln, die 1-2 mm groß sind. „inaktive“ Ovarien weisen keine sichtbaren Funktionsgebilde auf (Freistedt et al. 2001a).

Karja et al. (2002) haben den Einfluss des ovariellen Zyklus auf die In-Vitro Reifung (IVM), die In Vitro Fertilisation (IVF) und die Entwicklung der befruchteten Oozyten untersucht. Es hat sich gezeigt, dass die Teilungs- bzw. Blastozystenrate bei den Oozyten, die aus Ovarien im „follikulären“ Stadium gewonnen wurden, niedriger war, als die Teilungs- und Blastozystenraten der Oozyten aus den „inaktiven“ bzw. den „lutealen“ Ovarien.

2.2. Follikel- und Eizellentwicklung in vivo und in vitro

Follikelentwicklung beschreibt einen Prozess, in dem einige Follikel den ruhenden Follikelpool verlassen und sich über einige Entwicklungsstadien zum dominanten Follikel entwickeln (Gordon 2003). Die Population der ovariellen Follikel kann in einen ruhenden Primordialfollikelpool und einen wachsenden Follikelpool (Primär-, Sekundär- und Tertiärfollikel) unterteilt werden (Kanitz et al. 2001).

In vivo beginnen die Oozyten nach Beendigung ihrer Wachstumsphase mit der nukleären Reifung durch das Eintreten in die Prophase I. Im Diplotän dieser Phase erfolgt ein Block der Kernreifung (Diktyotän). Das Diktyotän wird aufgrund der großen Kerngröße der Oozyte auch als Germinalvesikelstadium (GV) bezeichnet. Die Oozyte nimmt den Vorgang der Kernreifung, ausgelöst durch den LH-Peak, kurz vor der Ovulation wieder auf. Dieser Vorgang wird als Germinal vesicle breakdown (GVBD) bezeichnet. Zum Zeitpunkt der Ovulation befindet sich die Oozyte in der Metaphase II mit einem Polkörperchen und hat damit das Stadium einer befruchtungskompetenten Oozyte erreicht. In der Metaphase II erfolgt nun der zweite Block der Kernreifung. Dieser Block, und damit die Vollendung der 2. meiotischen Teilung, wird erst nach der Penetration eines Spermiums aufgehoben (Russe und Sinowitz 1991). Nach Eppig

(1993) wird die Eizellreifung (Maturation) beschrieben als ein Prozess zur Erlangung der Fähigkeit zur Fortführung und Vollendung der ersten meiotischen Teilung. Dieser Prozess beinhaltet auch die spätere Entwicklung bis zur Metaphase II und das Erlangen der zytoplasmatischen Reife für eine erfolgreiche Befruchtung.

Neben der nukleären Reifung spielt die zytoplasmatische Reifung der Eizelle eine wichtige Rolle. Diese ist z.B. charakterisiert durch eine Umverteilung sowie einer Zu- bzw. Abnahme bestimmter Zellorganellen (Eppig 1993). Progesteron und Östrogen sind vermutlich die Hauptregulatoren der zytoplasmatischen Reifung (Laufer et al. 1984). Die zytoplasmatische Reifung weist in vitro deutliche Unterschiede zur Reifung in vivo auf (Motlik und Fulka 1976). Unvollständige zytoplasmatische Reifung führt bei in vitro maturierten und befruchteten Oozyten dazu, dass sich die Oozyten nicht zu Blastozysten entwickeln können (Singh et al. 1997). Dieses Problem wird häufig bei IVM Systemen für feline Oozyten beobachtet (Wood et al. 1995, Wolfe und Wildt 1996).

Für die IVP werden aus den Ovarien kastrierter Katzen in der Regel Oozyten im GV-Stadium gewonnen. Bei den meisten Spezies treten Oozyten nach der Entfernung aus dem Follikel automatisch in die Kernreifung ein und es kommt zum GVBD. Dies ist auf die Tatsache zurückzuführen, dass sich in der Follikelflüssigkeit ein Oocyte Maturation Inhibitor (OMI) befindet, der von den Granulosazellen produziert wird (Russe und Sinowitz 1991). Für die aus den Follikeln gewonnenen Oozyten ist so eine In vitro Maturation möglich. Gegenwärtig erreichen ca. 40-60% der feline Oozyten in vitro die Metaphase II. (Farstadt 2000, Herrick und Swanson 2003). Farstadt (2000) hat bei seinen Untersuchungen zum Stand der Reproduktion von Katzen festgestellt, dass der Anteil von Oozyten, die die Metaphase II erreichen, niedriger ist als bei den Nutztieren (v. a Rind). Der höchste Anteil an Eizellen in der Metaphase II kann nach ca. 40-48 Std. der IVM erwartet werden, ähnlich dem Zeitraum von der Paarung bis zur Ovulation bei der Katze (Goodrowe et al. 1998). Einige Studien haben herausgefunden, dass die meisten Eizellen die Metaphase II innerhalb der ersten 24 Std. der IVM erreichen und dass die Befruchtung nach 40 Std. oder mehr Reifungsdauer keinen Einfluss auf die Entwicklung der Eizellen hat (Wolfe und Wildt 1996, Luvoni und Oliva 1993). Ein IVM System sollte alle dynamischen Veränderungen unterstützen, die von den Oozyten durchlaufen werden (Luvoni et al. 2006).

2.3. Entwicklungskompetenz von Eizellen

Die feline Oozyte erwirbt während der Follikulogenese eine Reihe von Leistungsmerkmalen, die das Entwicklungspotential beeinflussen. Das Erlangen der Entwicklungskompetenz gliedert sich in die Wiederaufnahme und Fortführung der meiotischen Teilung sowie die Durchführung zytoplasmatischer Reifungsvorgänge, die erfolgreiche Befruchtung, sowie die Anfänge der embryonalen Entwicklung bis zu einer Blastozyste (Luvoni et al. 2006). Fünf verschiedene Stufen bis zum Erwerb der Entwicklungskompetenz wurden von Sirard et al. (2006) an bovinen Oozyten beschrieben. Diese umfassen die Meiose, die frühe Embryonalentwicklung mit ersten Teilungsstadien sowie die Fähigkeit, sich zu einer Blastozyste zu entwickeln, eine Trächtigkeit zu induzieren und gesunde Nachkommen hervorzubringen. Erst nach dem Abschluss der Wachstumsphase erlangt die Oozyte ihre meiotische Kompetenz. (Maus: Sorensen und Wassarman 1976, Rind: Fair et al. 1995b). Im Rahmen des Erwerbs der meiotischen Kompetenz lassen sich nach Eppig (1993) zwei Phasen unterscheiden. Zunächst muss die Oozyte die Kompetenz zur Durchführung des Germinal vesicle breakdown (GVBD) bis zum Erreichen der Metaphase I erlangen (GVBD-Kompetenz). Die Oozyte erwirbt dann nach einer weiteren Entwicklungsphase die Kompetenz zur Fortführung der ersten meiotischen Reifeteilung ebenso wie für den Eintritt in die zweite meiotische Reifeteilung bis zur Arretierung in der Metaphase II. (Maus: Szybek 1972, Hamster: Iwamatsu und Yanagimachi 1975, Maus: Sorensen und Wassarman 1976). Auch das Wachstum und die Atresie ovarieller Follikel können einen Einfluss auf die Entstehung der Entwicklungskompetenz von Oozyten haben (Schwein: Hunter et al. 2005).

Wang und Sun (2007) beschreiben mehrere Faktoren, die im Zusammenhang mit der Entwicklungskompetenz von Eizellen stehen. Diese Faktoren besitzen auch eine Bedeutung bei der Beurteilung der Entwicklungskompetenz. Dabei werden intrinsische Faktoren und extrinsische Faktoren unterschieden.

Zu den intrinsischen Faktoren zählt der mitochondriale Status. Das Muster der Verteilung der Mitochondrien ist ein hoch dynamischer Prozess während der Eizellreifung und der frühen Embryonalentwicklung. Übereinstimmende Ergebnisse deuten an, dass die inadäquate Neuverteilung der Mitochondrien innerhalb des

Zytoplasmas ein Marker für die zytoplasmatische Unreife ist und eng mit geringer Entwicklungskompetenz verknüpft ist (Mensch: Bavister und Squirrell 2000, Schwein: Sun et al. 2001, Rind: Otdorff 2006). Da es sich bei der Feststellung dieser Reife um ein invasives Verfahren handelt, ist es für die Selektion der Oozyten vor einer IVP nicht geeignet. Dieser Parameter wird vor allem für die Entwicklung und Erprobung von Kulturverfahren und –medien herangezogen.

Nogueira et al. (2006) erhielten in ihren Untersuchungen an humanen Oozyten Hinweise auf eine mögliche Bedeutung der Aktivität der Phosphodiesterase (PDE) 3 und 4 als Beurteilungsparameter für die Entwicklungskompetenz. Phosphodiesterase 4 (PDE4D) kommt in Cumuluszellen, in Granulosazellen und in Thekazellen (PDE4B) vor, während man die PDE3 nur in Oozyten nachweisen kann (Nogueira et al. 2003). Bei Versuchen mit spezifischen PDE3 Inhibitoren konnte nachgewiesen werden, dass PDE3 eine wichtige Rolle bei der Oozytenreifung von Nagetieren (Tsafriri et al. 1996), beim Rind (Mayes et al. 2002) und bei den Primaten (Nogueira et al. 2003) spielt. Außerdem hat sich die Verwendung von spezifischen Inhibitoren zur Steuerung der PDE3-Aktivität als gute Methode erwiesen, um die Kulturbedingungen und die zytoplasmatische Reifung von unreifen humanen Oozyten zu verbessern (Nogueira et al. 2006).

De Matos et al. (2002) hat beim Schaf Untersuchungen zum intrazellulären Glutathiongehalt im Zusammenhang mit der Entwicklungskompetenz durchgeführt. Glutathion ist ein wichtiger Bestandteil bei der Bekämpfung freier Sauerstoffradikale im Kulturmedium. Cysteamin- und Beta-Mercaptoethanol-Zugabe zum IVM-Medium steigert den intrazellulären Glutathiongehalt (GSH) von Oozyten und verbessert dadurch die Embryonalentwicklung und die Qualität der Oozyten verschiedener Spezies. Die Oozyten mit einem höheren Glutathiongehalt zeigten in der Studie eine bessere Entwicklungskompetenz. Es konnte ebenfalls gezeigt werden, dass ein Cysteamin-Zusatz im Reifungsmedium die Embryonalentwicklung stimuliert. Sowohl Cysteamin als auch Beta-Mercaptoethanol stimulieren die GSH-Synthese. Der Anstieg von intrazellulärem GSH steht im Zusammenhang mit einem sinkendem Peroxyd Niveau in der Oozyte.

Ein weiterer intrinsischer Faktor ist die Glucose-6-Phosphat-Dehydrogenase Aktivität. Unreife Eizellen synthetisieren eine Vielzahl an Proteinen, darunter auch Glucose-6-

Phosphat-Dehydrogenase, ein Enzym des Pentosephosphatweges. G6PDH ist aktiv in wachsenden Oozyten, die meiotisch inkompetent sind. In kompetenten Oozyten nach der Wachstumsphase sinkt die Aktivität des Enzyms deutlich ab. Mit Hilfe der Brillantcresylblau- Färbung kann die G6PDH-Aktivität beurteilt werden. Auf die Bedeutung der G6PDH-Aktivität in der Selektion von Oozyten wird in Kapitel 2.4.2. genauer eingegangen.

Zu den extrinsischen Faktoren zählen nach Wang und Sun (2007) die nachfolgend beschriebenen Faktoren.

Einige Studien konnten zeigen, dass die Apoptoserate der Cumuluszellen einen Einfluss auf die Entstehung der Entwicklungskompetenz hat. Die meisten durchgeführten Studien kommen überein, dass es zwischen dem Grad der Apoptose in den Cumuluszellen eine negative Korrelation zur Entwicklungskompetenz gibt (Mensch: Host et al. 2000, Mensch: Saito et al. 2000, Mensch: Lee et al. 2001, Rind: Zeuner et al. 2003, Rind: Yuan et al. 2005). Zum Nachweis gibt es jedoch nur sehr aufwändige Verfahren, die eine weitere Nutzung der selektierten COK für die IVP ermöglichen.

Zu den extrinsischen Faktoren nach Wang und Sun (2007) wird auch das Expressionsmuster von Insulin-like growth factor (IGFs) und IGF bindenden Proteinen in der Follikelflüssigkeit gezählt. Nach Wang und Sun (2007) beschreiben die Autoren verschiedener Artikel erfolgreich die Bestimmung der Entwicklungskompetenz, indem sie das Expressionsprofil von IGF- Bindungsproteinen (IGFBPs, IGFBP4 und IGFBP5) in der Follikelflüssigkeit als Selektionskriterium verwenden. Insgesamt scheint das Expressionsmuster von IGFs und/oder von IGFBPs in der Follikelflüssigkeit ein nicht invasiver, brauchbarer Indikator zur Bestimmung der Oozytenqualität zu sein. Dieses Verfahren muss jedoch noch verfeinert und spezifiziert werden.

Wang und Sun (2007) beschreiben, dass verschiedene Autoren die Konzentration einzelner Steroide in der Follikelflüssigkeit zur Beurteilung der Entwicklungskompetenz herangezogen haben. Wenn man das komplexe Zusammenspiel zwischen den Steroiden betrachtet, könnten multifaktorielle Kriterien eine gute Hilfe bei der Beurteilung der Oozytenqualität sein. Die Progesteronkonzentration in der Follikelflüssigkeit steigt durch die Zugabe (durch Injektion) von luteinisierendem

Hormon (LH) oder follikelstimulierendem Hormon (FSH) bei Schweinen (Xia et al. 1994, Coskun et al. 1995), den Ratten (Zhang und Armstrong, 1989) und beim Rind (Armstrong et al. 1996). Progesteron scheint die Interaktion zwischen der Oozyte und den Cumuluszellen zu fördern, wenn es zu den Medien in den Konzentrationen zugegeben wird, die auch in der Follikelflüssigkeit vorhanden sind (Schwein: Mattioli et al. 1998). Außerdem steigert die Zugabe von Östrogen oder Testosteron im Reifungsmedium die Entwicklungskompetenz von Rinderoozyten nach der IVF (Silva und Knight, 2000). Arias-Alvarez et al. (2009) haben beim Kaninchen Untersuchungen zur Leptin Konzentration in der Follikelflüssigkeit oder im Serum durchgeführt. Leptin ist ein Proteohormon und spiegelt den Anteil an Körperfett wieder. Es könnte als ein Indikator für die Oozytenqualität herangezogen werden. Ziel dieser Studie war es zu untersuchen, ob Leptin die meiotische und zytoplasmatische Reifung und die Ausschüttung von Steroidhormonen durch die Cumuluszellen beeinflusst. In dieser Studie konnte dafür jedoch kein Nachweis erbracht werden. Leptin konnte in humanen Oozyten und in der Follikelflüssigkeit nachgewiesen werden. (Karlsson et al. 1997). Es konnte aber keine klare Aussage über die Verwertbarkeit von Leptin im Zusammenhang mit der Entwicklungskompetenz festgestellt werden. Joo et al. (2010) haben ebenfalls Untersuchungen mit Leptin im Zusammenhang mit der Entwicklungskompetenz von Oozyten durchgeführt. Bei Mäusen wurde Leptin während der Superovulation injiziert und es zeigte sich, dass die Ovulationsrate und die Entwicklungskompetenz anstiegen. Sirotkin et al. (2009) kamen zu den gleichen Ergebnissen bei Untersuchungen mit Oozyten von Kaninchen.

Cumuluszellen, die die Oozyten während der Follikelentwicklung und zum Zeitpunkt der Ovulation umgeben, spielen eine wichtige Rolle im Zusammenhang mit der Eizellentwicklung, -reifung und der Befruchtung. Die Verbindung zwischen den Cumuluszellen untereinander und zwischen Cumuluszellen und Oozyte wird durch Gap junctions vermittelt. Diese enge Verbindung ist für den Austausch metabolischer Stoffe und von Signalmolekülen notwendig (Buccione et al. 1990). Durch den engen Kontakt mit der Oozyte beeinflussen die Cumuluszellen das Wachstum der Oozyte und die zytoplasmatische Reifung. Sie ermöglichen auch die Bereitstellung von Energiesubstraten und sind beteiligt an der Inhibition wie auch an der Wiederaufnahme der Meiose (Ratte: Larsen et al. 1996, Carabatsos et al. 2000). Mc Kenzie et al. (2004) hat Untersuchungen durchgeführt, ob das Expressionsmuster von Cumuluszellen als

Parameter für die Entwicklungskompetenz herangezogen werden kann. Im Ergebnis wurde in dieser Untersuchung festgestellt, dass die Verwendung eines einzigen Gens, Gremlin, eine genaue Voraussage über Maturation, Befruchtungspotential und Embryonenqualität liefern kann.

Unzweifelhaft führen die Studien zum Expressionsmuster von Cumuluszellen zum besseren Verständnis des Mechanismus der Eizellreifung und ermöglichen es, Aussagen zur Oozytenqualität machen zu können (Wang und Sun 2007).

2.4. Beurteilung der Entwicklungskompetenz

2.4.1. Morphologie

Das morphologische Erscheinungsbild ist bei COK das vor der Verwendung im Rahmen einer IVP am häufigsten herangezogene Kriterium zur Beurteilung der Oozytenqualität. Die Qualität der Oozyten kann nach Lasiene et al. (2009) durch folgende Kriterien beurteilt werden: Die Struktur des COK, die Kompaktheit und Dicke des Cumulus, die Färbung und die Beschaffenheit des Zytoplasmas, die Form, Größe und Oberfläche des Polkörperchens, die Größe des perivitellinen Raums, die Zona Pellucida und die meiotischen Spindel. Beim Rind hat sich eine Beurteilung des Zytoplasmas und des Cumulus oophorus als guter Parameter für die Klassifizierung erwiesen. Eine bovine Oozyte guter Qualität weist ein einheitlich dunkles homogenes Zytoplasma auf und ist von mehreren Cumuluslagen umgeben. Bei den Oozyten schlechter Qualität ist das Zytoplasma aufgehellt bis mosaikartig und die Cumuluszellen fehlen fast vollständig (Gordon 2003). Durch den unterschiedlichen Grad der zytoplasmatischen Transparenz in den Oozyten verschiedener Spezies gibt es im Hinblick auf die Beurteilung des Zytoplasmas unterschiedliche Kriterien (Wang und Sun 2007). So zeigen humane Oozyten schlechter Qualität ein dunkles Zytoplasma, wohingegen ein dunkles Zytoplasma in porcinen Oozyten eine gute Qualität bedeutet (Zeuner et al. 2003).

Die Beurteilung des Cumulus oophorus hat sich aufgrund der Bedeutung der Cumuluszellen für die Reifung und die weitere Entwicklung der Oozyte als Klassifizierungsparameter bewährt. Motlik et al. 1986 haben bei Oozyten vom Schwein die Verbindung zwischen den Cumuluszellen und zwischen Cumuluszellen und der

Eizelle untersucht. Es hat sich gezeigt, dass die innersten Cumuluszellen den engen Kontakt zwischen der Oozyte und der follikulären Umgebung (mindestens bis zur Metaphase I) sicherstellen. Sie kamen zu dem Schluss, dass nur Oozyten, die mit Granulosazellen co-kultiviert wurden, oder die mit ihren Granulosazellen in einem Medium mit LH kultiviert wurden, eine gute Entwicklungskompetenz nach der Befruchtung zeigten.

Bei bovinen Oozyten hat sich auch der Durchmesser der Zona pellucida als möglicher Parameter zur Klassifizierung herauskristallisiert. De Witt und Kruip (2001) konnten einen Zusammenhang zwischen der follikulären Atresierate und dem Durchmesser der Zona pellucida herstellen. Eine erhöhte Atresierate führt zu einem größeren Durchmesser der Zona pellucida und damit zu einem größeren Durchmesser der Oozyte. Dies bedeutet eine größere Entwicklungskompetenz.

Bei feline Oozyten gibt es bei verschiedenen Arbeitsgruppen unterschiedliche Ansätze zur Klassifizierung. Bei den meisten Studien, die sich mit der IVM feline Oozyten beschäftigen, erfolgte die Klassifizierung der Oozyten anhand morphologischer Kriterien. Bei Wood und Wildt (1997) findet man eine Klassifizierung von feline Oozyten unter Einbeziehung der Beschaffenheit des Zytosplasmas und der Zahl der Cumuluszelllagen. In der Studie von Wood und Wildt wurde eine Unterteilung in vier Klassen vorgenommen. Oozyten der Klasse I hatten ein gleichmäßiges granulierte Zytosplasma und mindestens fünf Cumuluszelllagen. Die Klasse II hatte weniger als fünf Cumuluszelllagen. Die Klassen III und IV zeichneten sich dagegen durch ein aufgehellt mosaikartiges Zytosplasma und einen Verlust der Cumuluszellen aus. In den meisten Studien wurden Oozyten mit zwei und mehr Cumuluslagen verwendet. (Nagano et al. 2008, Freistedt et al. 2001, Boglio et al. 2001). Bristol-Gould und Woodruff (2006) haben neben den oben genannten Kriterien auch den Durchmesser der Oozyten erfasst. Bei ihren Untersuchungen zur Follikulogenese von feline Oozyten stellten sie fest, dass die Oozyten in den unterschiedlichen Follikeln unterschiedlich aufgebaut sind. Die Oozyten im Primordialfollikel wurden in 3 Kategorien eingeteilt. Der erste Typ mit 1-8 Lagen von Cumuluszellen hat einen Durchmesser von 20-30µm. Der zweite Typ besitzt nur eine einzige Cumuluszelllage und hat ebenfalls einen Durchmesser von 20-30µm. Der dritte Typ Oozyten hat einen Durchmesser von 30-50µm und eine einzige Lage kubischer Granulosazellen. In den Sekundärfollikeln befinden sich durch die größere

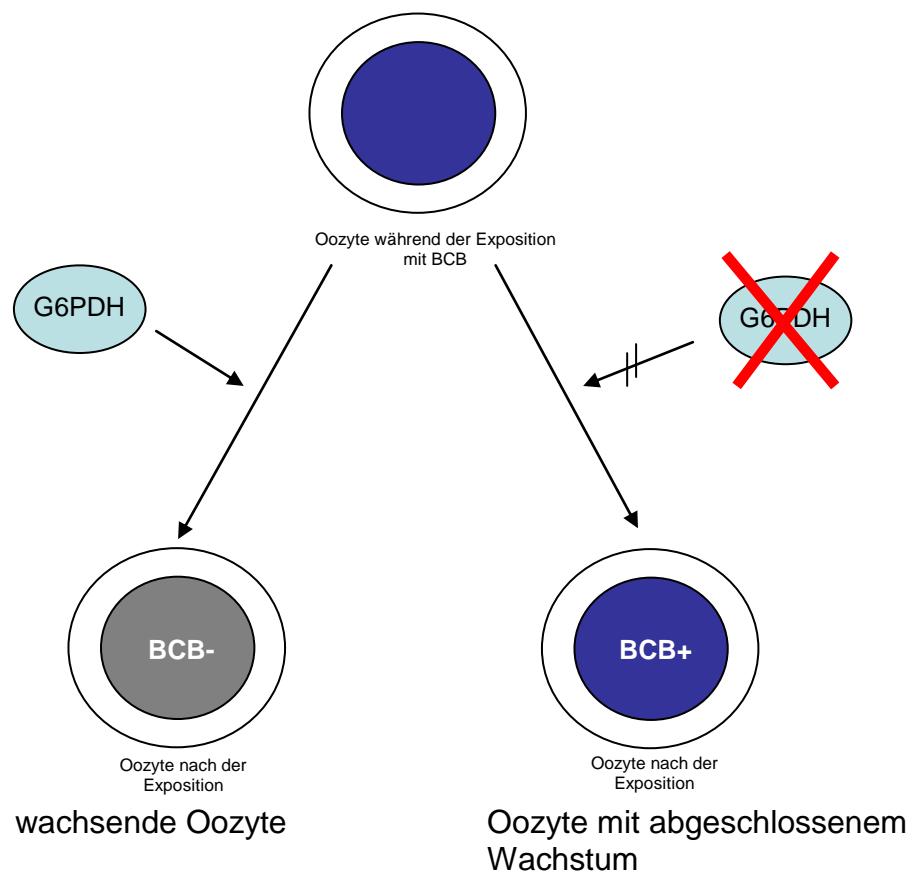
Anzahl von Zelllagen Oozyten mit einem Durchmesser von 40-75µm. Die Oozyten in den Antralfollikeln haben ca. einen Durchmesser von 75-90µm. In dieser Studie wurde keine Eizellgewinnung durchgeführt. Die Erkenntnisse lassen sich daher nicht zur Beurteilung der Entwicklungskompetenz nutzen. Bei Luvoni et al. (2006) wurden nur Oozyten mit dunklem Zytoplasma verwendet, die einen Durchmesser von mehr als 100µm haben und die mit mindestens einer Lage Cumuluszellen umgeben sind.

2.4.2. Grundlage der Brillantcresylblau- Färbung (BCB)

Die Verwendung einer Vitalfärbung mit BCB, zur Selektierung von Oozyten für die IVP, gewinnt in der Literatur immer mehr Beachtung. Die ersten Untersuchungen mit BCB für die Selektion von Oozyten mit BCB findet man bei Ericson et al. (Schwein, 1993). Um eine nicht invasive Methode für die Selektion von homogeneren und Entwicklungskompetenteren Eizellen für die IVP zu etablieren, wurde die Brillantcresylblaufärbung bereits beim Rind (Pujol et al. 2000, Pujol et al. 2004, Alm et al. 2005, Bhojwani et al. 2007, Torner et al. 2008), beim Büffel (Manjunatha et al. 2007), bei der Ziege (Rodriguez-Gonzales et al. 2002, Rodriguez-Gonzales et al. 2003, Urdaneta et al. 2003), beim Schwein (Ericson et al. 1993, Roca et al. 1998, Wongsrikeao et al. 2006), beim Hund (Rodrigues et al. 2009), beim Pferd (Mlodawska et al. 2005) und bei der Maus (Wu et al. 2007) verwendet. Unreife Eizellen synthetisieren bekanntermaßen eine Vielzahl von Proteinen, unter anderem Glucose-6-Phosphat-Dehydrogenase (G6PDH) (Wassarman 1988). Dieses Enzym ist in der wachsenden Oozyte aktiv (Mangia, 1975). G6PDH ist ein Enzym des Pentosephosphatweges, das in der ersten Hälfte der S-Phase der Wachstumsphase einer Oozyte synthetisiert wird (Wassarman 1988). Es stellt Ribosephosphat für die Nucleotidsynthese bereit und der größte Anteil des Nicotinamidadenindinukleotidphosphates (NADPH) dient als Wasserstoff- oder Elektronendonator bei den Synthesereaktionen wie zum Beispiel der Bildung von Fettsäuren (de Schepper et al. 1987). Die G6PDH Aktivität spielt eine kritische Rolle beim Zellwachstum, um NADPH für die Redoxregulierung bereitzustellen. BCB ist eine Farbzusammensetzung, die durch G6PDH-Aktivität farblos wird. Oozyten, die ihre Wachstumsphase abgeschlossen haben, zeigen verminderte G6PDH Aktivität. Diese Oozyten zeigen nach Inkubation in BCB ein blaues Zytoplasma, da sie nicht die Fähigkeit haben, BCB zu entfärbten (Ericsson et al. 1993). Die anschließende IVP mit Beurteilung der Teilungs- bzw. Blastozystenrate der BCB+ und

BCB- ist ein Kriterium zur Beurteilung dieses nicht invasiven Verfahrens. Da BCB nicht toxisch ist, ist eine nachfolgende Kultur möglich.

Abb. 1 Mechanismus der Brillantcresylblau-Färbung



2.4.3. Weitere Kriterien

Neben der direkten Beurteilung der Oozyten kann eine Selektion von felineen Oozyten auch bereits bei der Auswahl der Spendertiere erfolgen. Dies kann z.B. anhand des Zyklusstadiums, des Alters oder des Körpergewichts der Spenderkatze erfolgen. Bei manchen Studien wurden sowohl der saisonale Einfluss als auch der Status der Ovarien berücksichtigt. Freistedt et al. (2001) haben bei Ihren Studien das Jahr in vier Intervalle eingeteilt (Januar bis März, April bis Juni, Juli bis September und Oktober bis Dezember). Es hat sich gezeigt, dass die Teilungsrate von April bis Juni und von Juli bis September signifikant höher war, als bei den anderen beiden Intervallen. Die höchste Blastozystenrate trat zwischen Juli und September auf. Der saisonale Einfluss wurde bei Martins et al. 2009, Pope et al. (2009) und Spindler et al. (2002) nicht berücksichtigt. Der ovarielle Status wurde in einigen Studien ebenfalls erfasst. Es erfolgte eine Unterscheidung nach „frisch ovuliert“, „follikulär“, „luteal“, „intermediär“ und „inaktiv“ (Freistedt et al. 2001, Karja et al. 2002). Bei Freistedt et al. (2001) wurde auch das Körpergewicht der Spenderkatzen berücksichtigt. Es wurden zwar nur Katzen mit einem Körpergewicht von mind. 2,5 kg wurden in dieser Studie einbezogen, der Parameter wurde aber nicht speziell ausgewertet. In dieser Studie lag die Teilungsrate bei 50%, die Blastozystenrate bei 30,9% und die Blastozystenrate bezogen auf die geteilten Oozyten bei 61,1%. Gomez et al. (2000) überprüften den Einfluss einer hormonellen Stimulation auf die Qualität der gewonnenen Oozyten. In dieser Studie wurden nur Eizellen von Katzen verwendet, die vier Tage vor der Ovarektomie mit FSH stimuliert wurden. In ihrer Studie hat sich gezeigt, dass Oozyten, die von Katzen gewonnen wurden, die vorher mit FSH stimuliert wurden, eher ihre meiotische Reifung abgeschlossen hatten als Oozyten von Tieren, bei denen keine vorherige Stimulation erfolgte.

2.5. In-vitro-Produktion von felineen Embryonen

2.5.1. Gewinnung von Eizellen

Bei den meisten Versuchen wurde das Slicingverfahren zur Gewinnung der Eizellen angewandt. Bei diesem Verfahren wird die Ovaroberfläche eingeschnitten und mit etwas Slicingmedium abgespült. Die Cumulus-Oozyten-Komplexe (COK) werden dann unter dem Stereomikroskop aufgesucht. Dieses Verfahren findet man unter anderem bei

Versuchen mit felinen Oozyten bei Martins et al. (2009), Ciani et al. (2008), Katska-Ksiazkiewicz et al. (2003) und bei Wood et al. (1997). Es gibt jedoch auch die Möglichkeit, die Eizellen der Katze durch Punktion des Ovars und Aspiration zu gewinnen (Pope et al. 2009, Lopes et al. 2004, Luvoni et al. 1993, ca. einundzwanzig Oozyten pro Ovar). Dieses Verfahren ist jedoch wesentlich aufwändiger und führt zu einer geringeren Gewinnungsrate. Beim Slicing lässt sich eine wesentlich höhere Rate gewinnen.

2.5.2. Medien und Zusätze für die In-vitro-Maturation (IVM)

In der Literatur zur IVM von felinen Oozyten gibt es einige Autoren, die sich damit befassen, welches Kulturmedium für die IVM am besten geeignet ist. In den meisten Arbeiten findet man Hepes-gepuffertes Tissue Culture Medium(TCM 199). Katska-Ksiazkiewicz et al. (2003) haben den Einfluss von Synthetic Oviductal Fluid (SOF) und TCM 199 auf die Maturation von Katzeneizellen untersucht. Im Ergebnis hat sich gezeigt, dass die Teilungsraten bzw. Blastozystenraten bei Verwendung der beiden Medien sich nicht signifikant unterscheiden. Auch Boglio et al. (2001) haben den Einfluss beider Medien auf die Maturationsrate untersucht. Sie kamen jedoch zu dem Ergebnis, dass die Zahl der Oozyten, die die Metaphase II erreichen, bei Verwendung von SOF, mit 80% signifikant höher ist, als bei TCM 199 mit 66,7%. Bei dieser Studie gibt es jedoch keine Untersuchungen zur Teilungs- bzw. Blastozystenrate. In den meisten Arbeiten zur IVP der Katze findet man TCM als Medium (Freistedt et al. 2001a, Karja et al. 2002a, Murakami et al. 2002 und Gomez et al. 2003).

Wood et al. (1995) haben den Einfluss von Hormonzugaben bei der IVP untersucht. Sie konnten den positiven Einfluss der Zugabe von FSH und LH bei der IVF und der Embryonalentwicklung nachweisen. Diese Ergebnisse zeigen, wie wichtig exogenes Gonadotropin und Östrogen für die Kultivierung von Oozyten ist. Diese Studie ergab auch, dass die Anwesenheit von FSH, LH und Östradiol die Teilungsraten von Oozyten verbessert. Exogenes Gonadotropin scheint in Gegenwart von Östrogen die meiotische Reifung zu fördern. FSH stimuliert die Produktion eines reifungsfördernden Faktors durch einen cAMP abhängigen Prozess. Dies bedeutet, dass FSH und LH in vivo das Follikelwachstum stimulieren und die Lebensfähigkeit der Oozyte erhalten. Die Zugabe von FSH und LH findet sich bei den meisten Autoren. Die verwendeten

Konzentrationen sind jedoch sehr unterschiedlich, von 0,02 IU/ml (FSH und LH) (Freistedt et al. 2001a) bis 2,2 IU/ml (Herrik und Swanson 2003). Eine Erklärung für die Verwendung unterschiedlicher Konzentrationen könnte die unterschiedliche biologische Aktivität der verwendeten Präparate sein. In weiteren Studien findet sich in der Literatur auch noch die Zugabe von 1 μ g/ml 17 β -Östradiol. (Wood et al. 1997, Pope et al. 1999, Karja et al. 2002a, Murakami et al. 2002, Comizzoli et al. 2003).

Als weiteren Bestandteil findet man in der Literatur standardmäßig Antibiotika (Gentamicinsulfat oder Penicillin G), Calciumlaktat, Natriumpyruvat und L-Glutamin. Als Zwischenprodukt für die GSH-Synthese wird L-Cystein zugegeben (Schwein: Yoshida et al. 1993). Als Proteinquelle wird bovines Serumalbumin (BSA) bevorzugt. Bei den meisten Arbeiten wird ein IVC-Medium mit 0,4-0,6% BSA verwendet (Murakami et al. 2002, Karja et al. 2002a, Bogliolo et al. 2001). Johnston et al. (1991a) konnten jedoch zeigen, dass sich fetales Kälberserum und das Serum östrischer Katzen im Austausch von BSA positiv auf die Entwicklung feliner Embryonen auswirkt.

2.5.3. Brutschrankbedingungen

Johnston et al. (1991b) haben in ihrer Studie den Zusammenhang zwischen verschiedenen Temperaturen und unterschiedlichen Gaskonzentrationen bei der IVP untersucht. Sie kamen zu dem Ergebnis, dass unterschiedliche Konzentrationen und Temperaturen keinen Einfluss auf die Embryonalentwicklung haben. Bei fast allen Studien wurden die Katzeneizellen bei maximaler Luftfeuchtigkeit unter 5% CO₂ in Luft bei 38,0 – 39,0°C kultiviert (Pope C. E. et al. 2009, Nagano M. et al. 2008, Kityanat et al. 2003, Comizzoli et. al. 2003, Murakami et al. 2002, Luvoni et al. 2000). Der Standard beim Rind beträgt nach Gordon (2003) 39°. Da der O₂ Gehalt physiologisch erniedrigt ist, findet man in vielen Studien eine Begasung mit 90% N₂, um einen O₂-Gehalt von weniger als 5% zu erreichen. Bei anderen Autoren findet man eine Begasung mit 90% N₂ nur bei der IVM (Uchikura et al 2010, Ciani et al. 2008, Merlo et al. 2008).

2.5.4. Reifungsdauer

Katska-Ksiazkiewicz et al. (2003) haben Untersuchungen zur unterschiedlichen Reifungsdauer von felineen Oozyten durchgeführt. Es wurde die IVM für 6 Gruppen mit einer Reifungsdauer von 17 Std. bis maximal 45 Std. durchgeführt. Die Ergebnisse zeigten, dass es zwei „Wellen“ der Kernreifung bei felineen Oozyten gibt. Die erste Welle findet man nach 26 Std. IVM, wobei es sehr wahrscheinlich ist, dass die meisten Oozyten innerhalb von 17-18 Std. das Stadium der Metaphase II erreichen. Die zweite Welle findet man nach ca. 28-30 Std IVM. In den meisten Studien herrscht eine Reifungsdauer von 23-26 Std vor. (Herrick et al. 2009, Nagano et al 2008, Pope et al. 2009, Spindler et al. 2000).

2.5.5. In-vitro-Fertilisation (IVF)

Gewinnung der Spermien

Das Sperma für die IVF wurde bei den meisten Studien aus den Nebenhoden von Katern nach Kastration gewonnen. (Nagano et al. 2008, Bogliolo et al. 2001, Karja et al. 2002, Freistedt et al. 2001). Die Spermagewinnung erfolgt bei Bogliolo et al. (2001) durch die Spülung des Ductus deferens. Bei anderen Studien wird der Nebenhoden zerkleinert und Gewebestücke werden anschließend gespült (Nagano et al. 2008, Karja et al. 2002, Freistedt et al. 2001a). Bei einigen Versuchen findet man Frischsperma von konditionierten Katern, das mit Hilfe einer künstlichen Scheide gewonnen wurde (Herrick et al. 2009, Gomez et al. 2000, Sojka et al. 1970). Eine weitere Möglichkeit der Gewinnung von Sperma beim Kater ist die Elektroejakulation (Herrick et al. 2009, Tebet et al. 2006, Wildt et al. 1991, Wildt et al. 1983). Die Spermien werden unmittelbar nach der Gewinnung für die IVF verwendet, gekühlt gelagert oder kryokonserviert.

Technik der IVF

Die Separierung motiler Spermien für die IVF erfolgt in der Regel durch das Swim-up Verfahren (Parrish et al. 1986). Anschließend erfolgt eine Motilitätskontrolle des Spermias. Die Motilität sollte bei mindestens 50% liegen. Durch Waschen und Zentrifugieren mit speziellem IVF-Medium bei 300-500g für 5-8 Min wird die

Verdünnungsflüssigkeit entfernt (Wolfe und Wildt 1996, Wood und Wildt, 1997, Spindler und Wildt, 1999, Karja et al. 2002a, Comizzoli, 2006, Herrick et al. 2009). Nach dem Zentrifugieren wird der Überstand abpipettiert und das Spermienpellet resuspendiert. Als Medium wird überwiegend Ham's F10 verwendet. Es folgt eine Inkubation von 0,5-1 Std. bei Raumtemperatur (Gomez et al. 2003, Luvoni und Pellizzari, 2000, Spindler und Wildt, 1999). Im Anschluss an das Swim-up-Verfahren erfolgt eine erneute Motilitäts- und Konzentrationsprüfung (Herrick et al. 2009, Luvoni und Pellizari 2000, Hay und Goodrowe 1993).

Für die IVF wurden bei den meisten Gruppen die Oozyten nach einem oder, mehreren Waschvorgängen in einen 50-100 μ l großen Tropfen unter Öl verbracht und die Spermensuspension wurde in die Tropfen pipettiert. Die Inkubationszeit variiert bei den meisten Studien von 12-18 Std. (Comizzoli et al. 2006). Bei manchen Autoren findet man auch eine Inkubationszeit von 22-24 Std. (Herrick et al. 2009, Freistedt et al. 1999).

Bei verschiedenen Studien zur IVF von felineen Oozyten findet man bei unterschiedlichen Autoren (Gomez et al. 2000, Bogliolo et al. 2001, Comizzoli et al. 2006) auch die Intrazytoplasmatische Spermieninjektion (ICSI). Bei diesem Verfahren wird eine Samenzelle mit einer Injektionskapillare aufgenommen und durch Mikroinjektion in die Eizelle injiziert. Bei beiden Studien war die Blastozystenrate jedoch geringer als beim oben genannten Verfahren.

Spermienkonzentration für die IVF

Ein gängiges Verfahren zur Konzentrationsbestimmung von Spermien ist das Auszählen mit einer Zählkammer. Für die Befruchtung wird in den meisten Studien eine Konzentration von 2-5x10⁵ Spermien/ml verwendet (Herrick et al. 2009, Comizzoli et al. 2003, Spindler et al. 2000, Goodrowe et al. 1998). Es gibt jedoch auch Gruppen, die die zehnfache Konzentration verwenden (Karja et al. 2002, Murakami et al. 2002). Eine Erhöhung der verwendeten Spermakonzentration führte jedoch nicht zu einer Steigerung der Befruchtungsrate.

2.5.6. In-vitro-Kultivierung (IVC)

Durch Vortexen werden die Cumuluszellen von den zukünftigen Zygoten entfernt. Als Kulturmedium wird ein modifiziertes SOF verwendet. Die COKs werden für 7 Tage in SOF Medium unter Öl bei einer Temperatur von 39°C und mit 5% CO₂, 5% O₂ und 90% N₂ kultiviert (Nagano et al. 2008). Wie bei den Medien und bei den Brutschrankbedingungen beschrieben, findet man bei den Autoren Unterschiede in der Verwendung der Medien SOF und TCM und dem O₂ Gehalt. Es ist nachgewiesen, dass die Kultivierung in Gruppen einen positiven Effekt auf die Entwicklung hat (Spindler und Wildt 2002). Dies beruht auf der Tatsache, dass Embryonen einen auto- parakrinen Effekt haben. Bei einigen Arbeitsgruppen werden drei bis fünf Embryonen in 100µl Medium unter Öl kultiviert (Karja et al. 2002a, Murakami et al. 2002). Größere Gruppen werden in 400-500µl Medium kultiviert (Gomez et al. 2000, Freistedt et al. 2001a). Die Cumuluszellen werden durch vorsichtiges auf und ab pipettieren entfernt. Nach dreimaligem Waschen werden die Oozyten in Ham's F10 Medium verbracht und kultiviert (Comizzoli et al. 2006, Hoffert 1997).

Beurteilung der Teilungs- und Blastozystenrate

Die erste Zellteilung ist bei felinen Oozyten in vitro spätestens 24 Std. nach der Befruchtung abgeschlossen. Ab dem 5. Tag entwickelt sich der Embryo zu einer kompakten Morula und bis zum 8. Tag zu einer Blastozyste. Diese expandiert und beginnt ab dem 8. Tag zu schlüpfen (Wolfe und Wildt 1996, Wood und Wildt 1997). Die Teilungsrate wird bei den meisten Studien am 1.-4. Tag nach der Befruchtung beurteilt (Freistedt et al. 2001a, Bogliolo et al. 2001, Gomez et al. 2000, Goodrowe et al. 1998). Als geteilt gezählt werden in der Regel alle Embryonen mit mindestens zwei Blastomeren. Die Beurteilung der Blastozystenrate erfolgte in den meisten Fällen nach morphologischen Kriterien. Hier wurde nach den Richtlinien der IETS in den meisten Studien auf eine dunkle, gleichmäßige Färbung und eine gleichmäßige Form ohne Vakuolen oder Fragmentierung geachtet. Die Bestimmung der Blastozystenrate erfolgt am Tag 6-9 (Murakami et al. 2004, Gomez et al. 2003, Comizzoli et al. 2003, Freistedt et al. 2001, Gomez et al. 2000). Für die Beurteilung werden die Embryonen nach 72 Std. noch mindestens 3 Tage kultiviert, um die Entwicklung zu beurteilen. (Karja et al. 2002). Bei einigen Studien wurden die Blastozysten fixiert und gefärbt. Unter dem

Lichtmikroskop oder dem Fluoreszenzmikroskop wurde die Zahl der lebenden Zellen in den Blastozysten bestimmt (Nagamo et al. 2009, Spindler et al. 2000). Gegenwärtig erreichen unter optimalen Kulturbedingungen etwa 40-60% der Katzeneizellen die Kernreife. Die Befruchtungsrate nach in vitro Fertilisation von Eizellen von Hauskatzen liegt zwischen 40 und 50% und die der in vivo zwischen 60-80% (Farstadt et al. 2000). In den Studien zur IVP bei der Katze variiert die Blastozystenrate von 10 – 50% (Wolfe und Wildt 1996, Wood und Wildt 1997, Pope et al. 1997, Freistedt et al. 1999, Swanson et al. 1999).

3. Material und Methoden

3.1. Versuchsaufbau

3.1.1. Erster Versuchsabschnitt: Selektion feliner Oozyten mittels BCB-Färbung

Für den ersten Versuch wurden 1587 COK der Klassen I-III aus Ovarien kastrierter Katzen gewonnen. COK der Klasse IV wurden nicht verwendet.

682 COK wurden für 90 Min. in BCB verbracht und anschließend je nach Färbung des Zytoplasmas in BCB+ und BCB- aufgeteilt. Als Inkubationskontrolle (IK) wurden 239 Eizellen ebenfalls für 90 Minuten mit den BCB Gruppen inkubiert, jedoch ohne Farbstoff. Eine weitere Gruppe mit 666 COK wurde als Kontrollgruppe direkt der IVP unterzogen.

Für diesen Versuchsabschnitt wurden Katzen aller Altersgruppen verwendet. Nach der BCB-Färbung wurden die COK je nach der Gesamtgruppengröße in Gruppen von durchschnittlich 15-25 COK für 24 Std. maturiert. Es folgte eine IVF und eine Kultivierung bis zum Tag 9. Am 3. Tag wurde die Teilungsrate ermittelt. Die Embryonen wurden am Tag 7, 8 und 9 beurteilt.

3.1.2. Zweiter Versuchsabschnitt: Einfluss des Alters der Spenderkatze auf das Ergebnis der IVP

Beim zweiten Versuchsabschnitt wurden nur Ovarien von Katzen mit bekanntem Alter zum Kastrationszeitpunkt einbezogen.

Die Katzen wurden in folgende Altersgruppen eingeteilt: jünger als 9 Monate (Gruppe 1), jünger als 1,5 Jahre (Gruppe 2) und älter als 2 Jahre (Gruppe 3). Auch hier wurden nur COK der Klasse 1-3 verwendet. Die IVP erfolgte für jede COK-Klasse separat.

In diesem Versuchsteil wurden insgesamt 258 COK in Gruppen von 2-32 Eizellen für 24 Std. maturiert. Es folgte wie bei Versuchsabschnitt 1 eine IVF und eine Kultivierung bis zum Tag 9.

In der Gruppe 1 wurden 10 COK der Klasse I, 27 COK der Klasse II und 101 COK der Klasse III gereift. In der Gruppe 2 befanden sich 19 COK der Klasse I, 12 COK der

Klasse II und 26 COK der Klasse III. Die Gruppe 3 bestand aus 13 COK der Klasse I, 16 COK der Klasse II und 34 COK der Klasse III. Die Beurteilung der Teilungsrate erfolgte am Tag 3 und die Blastozystenrate wurde am Tag 7, 8 und 9 bestimmt.

Für beide Versuchsabschnitte wurden zur experimentellen Bearbeitung insgesamt 1845 Cumulus-Oozyten-Komplexe verwendet.

Die Versuche wurden von Oktober 2006 bis Juli 2008 durchgeführt.

Abb. 2 Schematische Darstellung des ersten Versuchsabschnitts

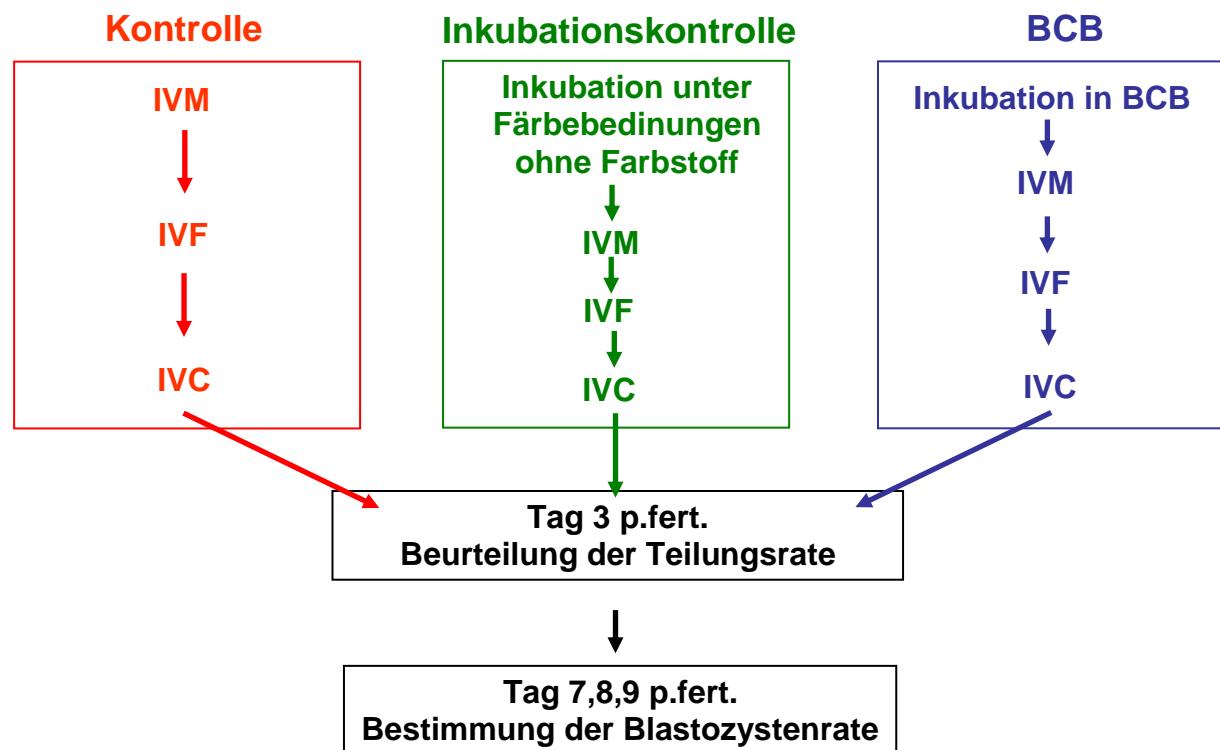
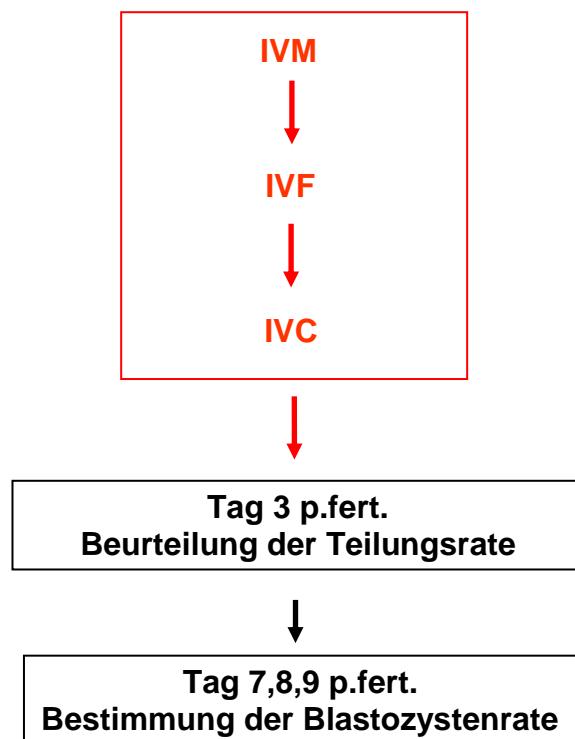


Abb. 3 Schematische Darstellung des zweiten Versuchsabschnittes



3.2. Herkunft des Probematerials

Die verwendeten Ovarien stammen aus Kastrationen vom Tierheim des Münchener Tierschutzvereins e. V. und aus verschiedenen Tierarztpraxen in München. Die Ovarien wurden innerhalb von 1-4 Stunden nach der Kastration verwendet. Bis zu diesem Zeitpunkt wurden sie in sterilen 50-ml Röhrchen (Fa. VWR, Darmstadt) mit Transportmedium bei Raumtemperatur gelagert.

Die praktischen Versuche wurden im IVF Labor der Chirurgischen und Gynäkologischen Kleintierklinik im Zentrum für klinische Tiermedizin der Ludwigs Maximilians Universität München durchgeführt.

3.3. Gewinnung von Oozyten

Die Ovarien wurden aus den sterilen Röhrchen entnommen und mit einer kleinen Klemme fixiert und mit Zellstoff abgetrocknet. Das überschüssige Gewebe wurde abgeschnitten.

Abb. 4 Katzenovar



Eine gerasterte Petrischale (90mm, Fa. VWR, Darmstadt) wurde mit etwas PBS-Lösung (phosphatgepufferte Salzlösung nach Dulbecco, (Fa. Biochrom, Berlin) benetzt. Die Oberfläche des Ovars wurde nun mit einer Skalpellklinge mehrmals gleichmäßig eingeschnitten (Slicing) und anschließend mit PBS abgespült. Ebenso wurde mit dem restlichen Ovarmaterial verfahren. Die COK werden unter dem Stereomikroskop (10-40 fache Vergrößerung) aufgesucht und in eine kleine Petrischale (40mm, Fa. VWR, Darmstadt) mit Reifungsmedium überführt. Es erfolgte eine Klassifizierung nach Tabelle 1. Danach wurden die COK (Klasse I-III) in einer 4-Wellenschale (Nunc-Multischale, Fa. VWR, Darmstadt) mit PBS in der linken oberen Vertiefung gesammelt. Alle Schritte wurden mit sterilisierten 20µm-Glaskapillaren und einem Pipettierhelfer (Fa. Brand, Wertheim) durchgeführt. Die Glaskapillaren wurden zwischen den einzelnen Schritten gewechselt.

Abb. 5 Slicing eines Katzenovars



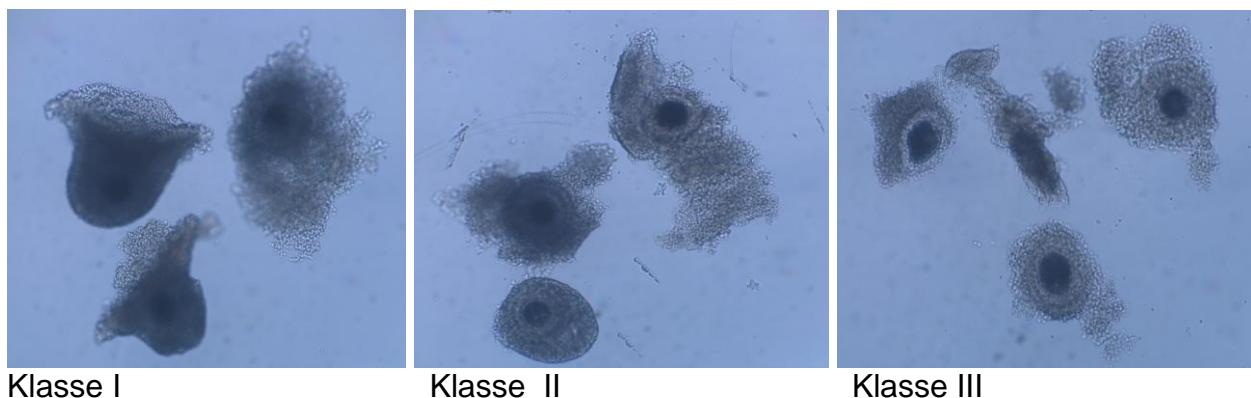
Tab. 1 Klassifizierung der Eizellen nach Wood und Wildt

Klassifizierung der Eizellen nach Wood und Wildt (1997)	
Klasse I	COKs mit einheitlichem dunklem granuliertem Zytoplasma mit fünf oder mehr Cumuluszellagen
Klasse II	COKs mit einheitlichem dunklem granuliertem Zytoplasma mit weniger als fünf Cumuluszellagen
Klasse III	COKs mit aufgehelltem mosaikartigem Zytoplasma nur zum Teil mit Cumuluszellen umgeben
Klasse IV	COKs mit aufgehelltem mosaikartigem Zytoplasma mit vollständigem Verlust der Cumuluszellen

Die Klassifizierung der Oozyten erfolgte anhand des oben stehenden Schemas nach Wood und Wildt (1997)

Für die Versuche wurden Eizellen der Klassen I-III verwendet.

Abb. 6 COK der Klassen I bis III



Nicht verwendet wurden Eizellen der Klasse IV

Abb. 7 COK der Klasse IV



3.4. BCB-Färbung (Versuch 1)

Für die BCB-Färbung wurde eine 4-Wellenschale (Fa. VWR, Darmstadt) verwendet. Die Oozyten der Inkubationskontrolle wurden in die linke Vertiefung pipettiert. In dieser befanden sich 500µl PBS-Lösung ohne Farbstoff. Die restlichen Oozyten wurden in die rechte Vertiefung der Schale überführt. In dieser befanden sich 500µl der Färbelösung (26µM BCB in PBS + 0,4% BSA). Die 4-Wellenschale wurde für 90 Min bei 38,5°C und maximaler Luftfeuchtigkeit in den Brutschrank (Fa. Memmert, Schwabach) verbracht.

Nach 90 Minuten erfolgte die Beurteilung der Zytoplasmafärbung unter dem Mikroskop (Axiovert 25, Fa. Zeiss). Die BCB+ Zellen (Zellen mit blauem Cytoplasma) und BCB- Zellen (Zellen mit ungefärbtem Zytoplasma) wurden selektiert und in die unteren Vertiefungen der 4-Well-Schale verbracht. Für die Selektion der einzelnen COKs

wurden feine Glaskapillaren verwendet. Da für die präzise Selektion sehr feine Kapillaren erforderlich waren wurden diese selbst hergestellt.

Es erfolgte ein Waschschnitt in PBS-Lösung und ein Waschschnitt in IVM Medium (Reifungsmedium, bzw. Maturationsmedium (s. Anhang).

Abb. 8 Versuchsaufbau der BCB-Färbung

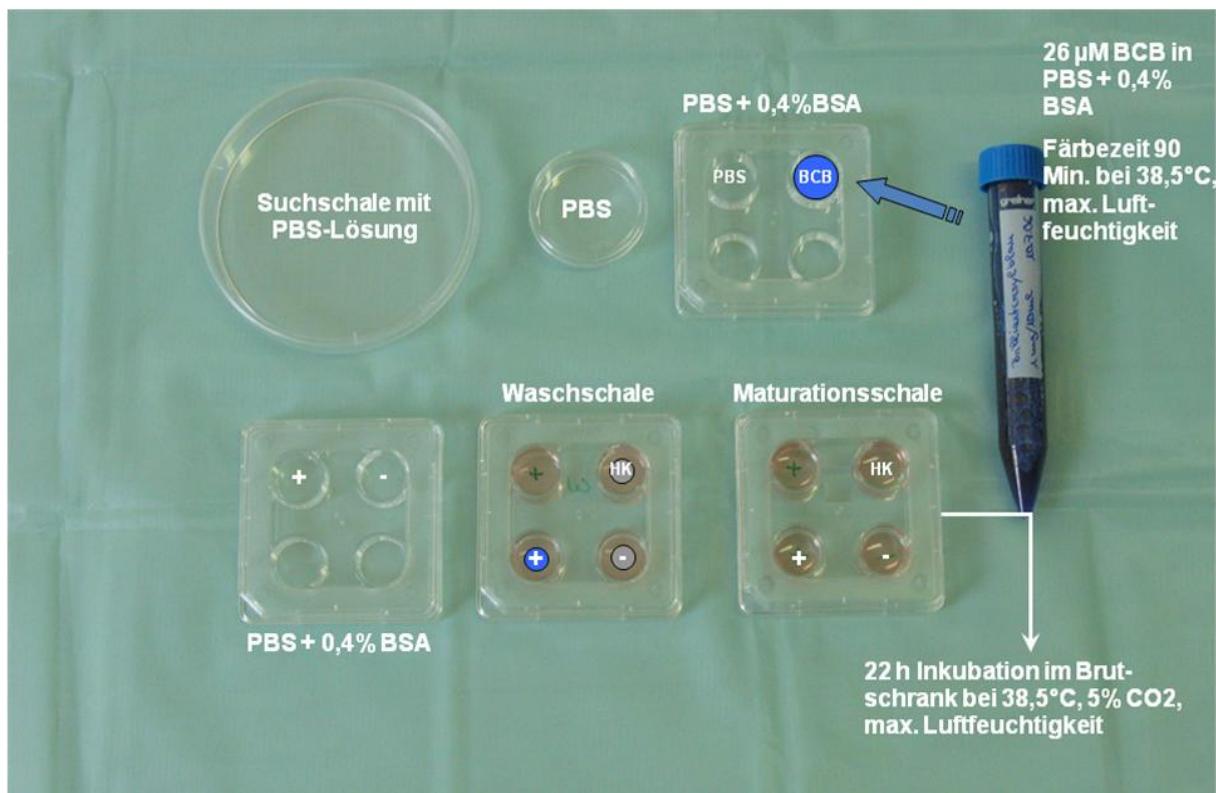
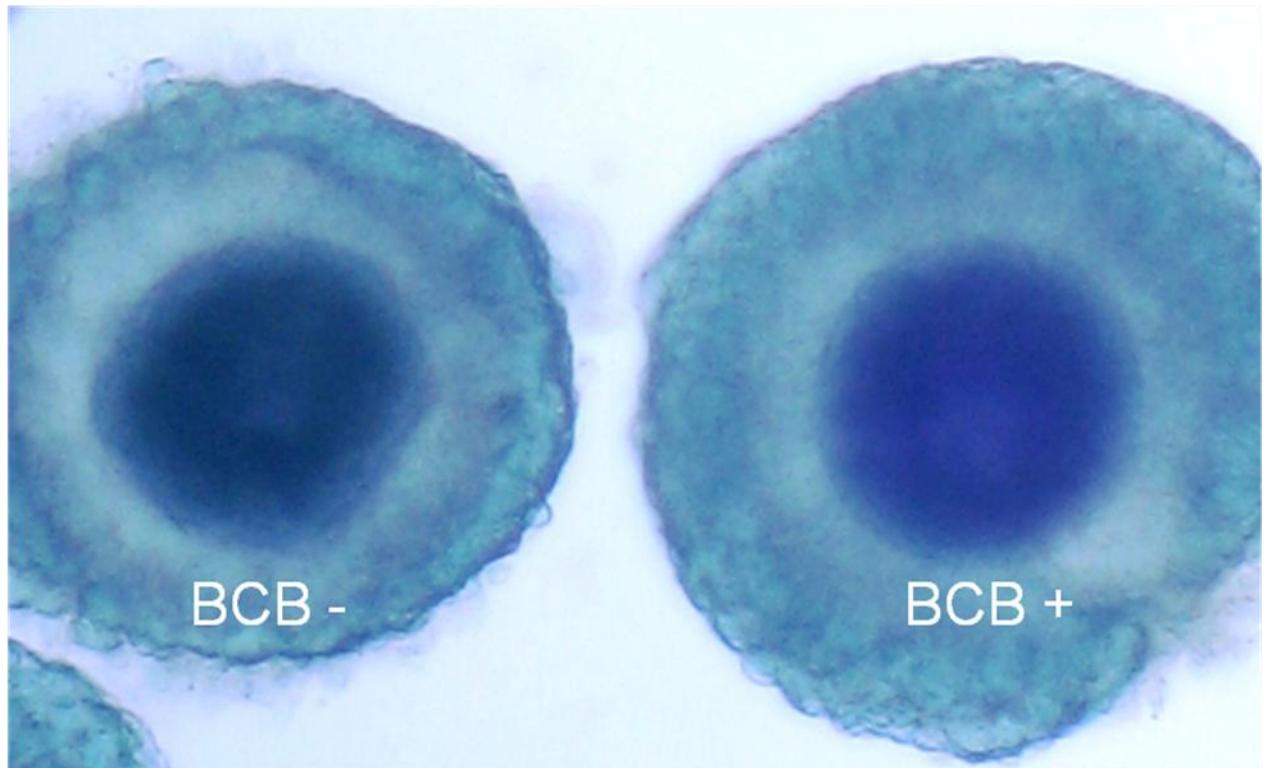


Abb. 9 Darstellung einer BCB- und BCB+ Oozyte



3.5. IVM

Die IVM wurde für beide Versuche in gleicher Weise durchgeführt. Für die IVM wurden 10-20ml Reifungsmedium (s. Anhang), abhängig von der Anzahl der Ovarien, hergestellt. Die COK der Kontrollgruppe wurden direkt nach dem Slicing in eine kleine Petrischale mit Reifungsmedium überführt. Es erfolgte ein Waschschritt in einer kleinen Petrischale, die ebenfalls mit Reifungsmedium gefüllt wurde. Die COKs wurden in die Vertiefungen einer 4-Wellenschale, die mit 500µl Reifungsmedium mit einem Hormonzusatz gefüllt wurden verbracht. Anschließend an diesen Waschschritt wurden die COK in eine identische 4-Wellenschale für die Reifung pipettiert. Beim zweiten Versuchsabschnitt wurden die COK nach Klassen getrennt in die 4-Wellenschalen pipettiert. Die Anzahl der Oozyten wurde im Protokoll festgehalten und es erfolgte eine Inkubation für 24 Std. bei 38,5°C und 5% CO₂ bei maximaler Luftfeuchtigkeit.

Die Oozyten der BCB-Gruppen und die Inkubationskontrollgruppe wurden nach der Inkubation in BCB und dem 1. Waschschritt in PBS in eine mit 500µl Maturationsmedium pro Well gefüllte 4-Wellenschale pipettiert.

Es erfolgte eine Inkubation für 24 Std. bei 38,5°C und 5% CO₂ bei maximaler Luftfeuchtigkeit. Die Inkubationszeit der BCB-Gruppen wurde um ca. 90 Min. verkürzt, da die COK bereits mit dem Farbstoff inkubiert wurden.

3.6. IVF und Aufbereitung der Spermien

3.6.1. Gewinnung der Spermien

Die IVF wurde für alle Versuchsgruppen in gleicher Weise durchgeführt.

Für die IVF wurde Nebenhodensperma von Katern nach Kastration verwendet. Falls es am gleichen Tag verfügbar war, wurde Frischsperma verwendet.

Die Hoden stammen ebenfalls aus Kastrationen vom Tierheim des Münchener Tierschutzvereins e. V. und aus verschiedenen Tierarztpraxen in München. Die Hoden wurden innerhalb von 1-4 Stunden verwendet. Bis zu diesem Zeitpunkt wurden sie in sterilen 50ml Röhrchen (Fa. VWR, Darmstadt) in Transportmedium bei 5°C gelagert. Die Hoden wurden aus dem Transportmedium entnommen, der Ductus deferens und der Cauda epididymidis isoliert, das überflüssige Gewebe entfernt und mit Zellstoff gesäubert. Bei unmittelbarer Verwendung wurde eine kleine Petrischale mit TL-Medium (s. Anhang) und bei Kryokonservierung mit Triladyl (Fa. Minitüb, Tiefenbach) benetzt. Das Gewebe wurde dann mit einem Skalpell zerkleinert und mit TL-Medium oder Triladyl Verdünner gespült und an der Skalpellklinge ausgedrückt. Das Gewebe wurde anschließend mit einer anatomischen Pinzette entfernt. Im Wasserbad wurde das TL-Medium bzw. der Triladyl Verdünner vor der Verwendung auf Raumtemperatur gebracht.

Bei 400-facher Vergrößerung wurde die Spermensuspension auf einem angewärmten Objektträger unter einem Mikroskop (Olympus CX 41) bezüglich der Vorwärtsbeweglichkeit und Dichte beurteilt. Ab einer Vorwärtsbeweglichkeit von 70% wurde das Sperma kryokonserviert.

Die Spermensuspension wurde 1:1 mit Verdünnermedium verdünnt und in Reaktionsgefäß (Fa. Eppendorf, Hamburg) aufbewahrt (maximal für 24 Std. im Kühlschrank).

3.6.2. Kryokonservierung der Spermien

Für die Kryokonservierung wurde die Spermiensuspension 1:1 mit Triladyl Verdünner verdünnt. Die Spermiensuspension wurde nun in 0,25 ml-Straws (Fa. Minitüb, Tiefenbach) aufgezogen. Bei der Befüllung verblieb ein Leerraum von ca. 0,5 cm. Die Straws wurden anschließend mit einem Stick verschlossen. Mit einem Folienstift wurden die Sticks mit dem Einfrierdatum und einer Nummer versehen. Die Vorwärtsbeweglichkeit und Informationen über die Dichte wurden festgehalten. Bei der IVF wurde die Nummer der verwendeten Straws auf dem Versuchsprotokoll festgehalten.

Die Pailletten wurden auf einem Styroporrack aufgereiht und für 1 Std. bei 5°C im Kühl-schrank gelagert. Eine Styroporbox wurde mit LN₂ gefüllt und in die Nähe des Kühl-schranks gestellt. Das Rack wurde vorsichtig aus dem Kühlschrank genommen, in der Box auf einen Steg gelegt und die Box wurde verschlossen. Die Straws blieben für 20 Min. in LN₂-Dampf. Anschließend wurden sie in Goblets in einen Stickstoffcontainer zur Aufbewahrung verbracht. Die Goblets wurden mit dem Inhalt beschriftet.

3.6.3. Swim-up

Für das Swim-up wurden 2-3 Straws (je nach Qualität) für 10s in einem 38° C warmen Wasser aufgetaut. Mit dem Swim-up wurde ca. 1,5 Std. vor Ablauf der Maturationszeit der Oozyten begonnen. Für den Swim-up wurden zwei kleine Röhrchen (Fa. Greiner, Frikenshausen) im Winkel von 45° in einem Reagenzglasständer aufgestellt. In die Röhrchen wurde jeweils 1ml TL-Swim-up- Medium pipettiert. Die Suspension wurde vorsichtig unter das Medium abgesetzt. Der Inhalt der Pailletten wurde gleichmäßig auf beide Röhrchen verteilt. Die Deckel wurden vorsichtig locker auf die Röhrchen gelegt. Der Ständer wurde dann für eine Stunde bei 38,5° C und 5% CO₂ in den Brutschrank gestellt. Ein leeres Zentrifugenröhrchen (15ml, Fa. Greiner, Frikenshausen) wurde ebenfalls in den Brutschrank gelegt.

Bei der Verwendung von Frischsperma wurde der Inhalt der Reaktionsgefäße vorsichtig unter die Suspension pipettiert.

Nach einer Stunde wurden aus jedem Röhrchen vorsichtig 800 μ l von oben abgenommen und in das Zentrifugenröhrchen pipettiert. Es erfolgte eine Zentrifugation bei 700g für 10 Minuten. Nach dem ersten Zentrifugieren wurde das Medium bis zum Spermienpellet abpipettiert und mit ca. 1,5 ml Swim-up-Medium aufgefüllt. Nach einer weiteren 10 minütigen Zentrifugation wurde erneut der Überstand bis zum Spermienpellet entfernt. Mit 40 μ l Befruchtungsmedium wurde das Pellet durch vorsichtiges Auf- und Abpipettieren resuspendiert.

3.6.4. Co-Kultivierung

Die Oozyten wurden aus der Reifungsschale mit möglichst wenig Medium in eine Waschschale mit Befruchtungsmedium umgesetzt. Anschließend erfolgte das Umsetzen in Befruchtungstropfen.

Für die Herstellung der Befruchtungstropfen wurden in eine kleine Petrischale 3 Tropfen mit 15 μ l Befruchtungsmedium pipettiert. Diese wurden mit Öl (Mineralöl Fa.Sigma, Steinheim) bedeckt. Anschließend wurden die 3 Befruchtungstropfen mit weiteren 45 μ l Medium aufgefüllt. Die einzelnen Oozytengruppen wurden in jeweils separate Tropfen verbracht.

Die Schale wurde dann bis zur Befruchtung in den Brutschrank gestellt. Je nach Dichte der Spermensuspension wurden jedem Befruchtungstropfen 15-30 μ l zugegeben. Pro Befruchtungstropfen wurden 100.000 Spermien zugegeben. Die Dichtebestimmung erfolgte mit einer Zählkammer nach Bürker-Türk unter 400-facher Vergrößerung. Im Dunkelfeld unter dem Stereomikroskop erfolgte die Kontrolle der Spermiedichte.

3.7. IVC

Die Kultivierung erfolgte nach 24 Std. in SOF-Medium (s. Anhang). In eine kleine Petrischale wurden 150 μ l Topfen Reifungsmedium verbracht und mit Öl überschichtet (pro Oozytengruppe zwei Tropfen). In jeden 2. Tropfen wurde 1 Gruppe aus den Befruchtungstropfen überführt. Mit einer 20ml Pipette erfolgte durch Auf- und Abpipettieren die Denudierung der Oozyten. Für einen weiteren Waschschritt wurden

die Oozyten in die restlichen Reifungstropfen pipettiert. Die Gruppen wurden bei jedem Schritt beibehalten.

Eine 4-Wellenschale mit 500 μ l Kultivierungsmedium Tag 1 (mit Öl überschichtet) wurde vorbereitet. Nach dem Waschschnitt wurden die Oozyten in die 4-Wellenschalen verbracht und bis zum Tag 3 im Brutschrank (Fa. Heraeus, Hanau) bei 38,5° C, 5% CO₂ und 5% O₂ inkubiert.

3.8. Beurteilung der Teilungs- und Blastozystenrate

Am Tag 3 nach der Kultivierung wurden die befruchteten Eizellen ermittelt und die Teilungsrate berechnet. Die Beurteilung erfolgte unter dem Stereomikroskop. Alle Embryonen mit mindestens 2 gleichmäßigen Blastomeren wurden als geteilt gezählt. Vor der Zählung wurden die Zygoten über einen Waschschnitt in SOF Medium Tag 4 (s. Protokoll) überführt. Die Beurteilung der Embryonen erfolgte am Tag 7,8 und 9.

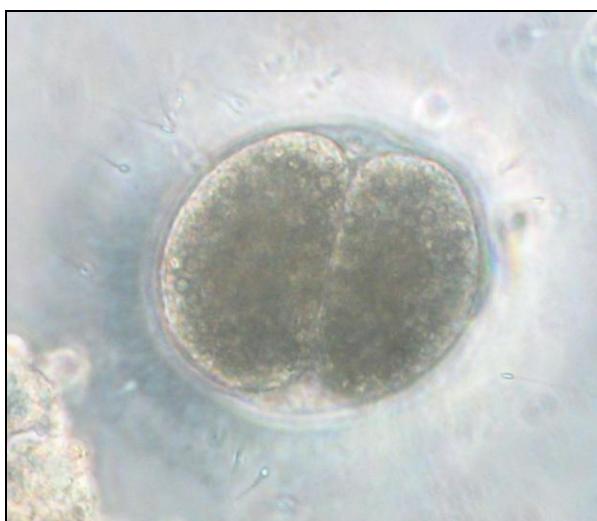


Abb. 10 Embryo mit 2 Blastomeren



Abb. 11 Blastozyste Tag 8

3.9. Statistische Auswertung

Zum Vergleich der Versuchsgruppen wurde ein Chi-Square-Test (Past Version 1.97) verwendet. Alle Ergebnisse, die $p < 0,05$ sind wurden als signifikant gewertet.

4. Ergebnisse

4.1. Einfluss der Selektion mit BCB

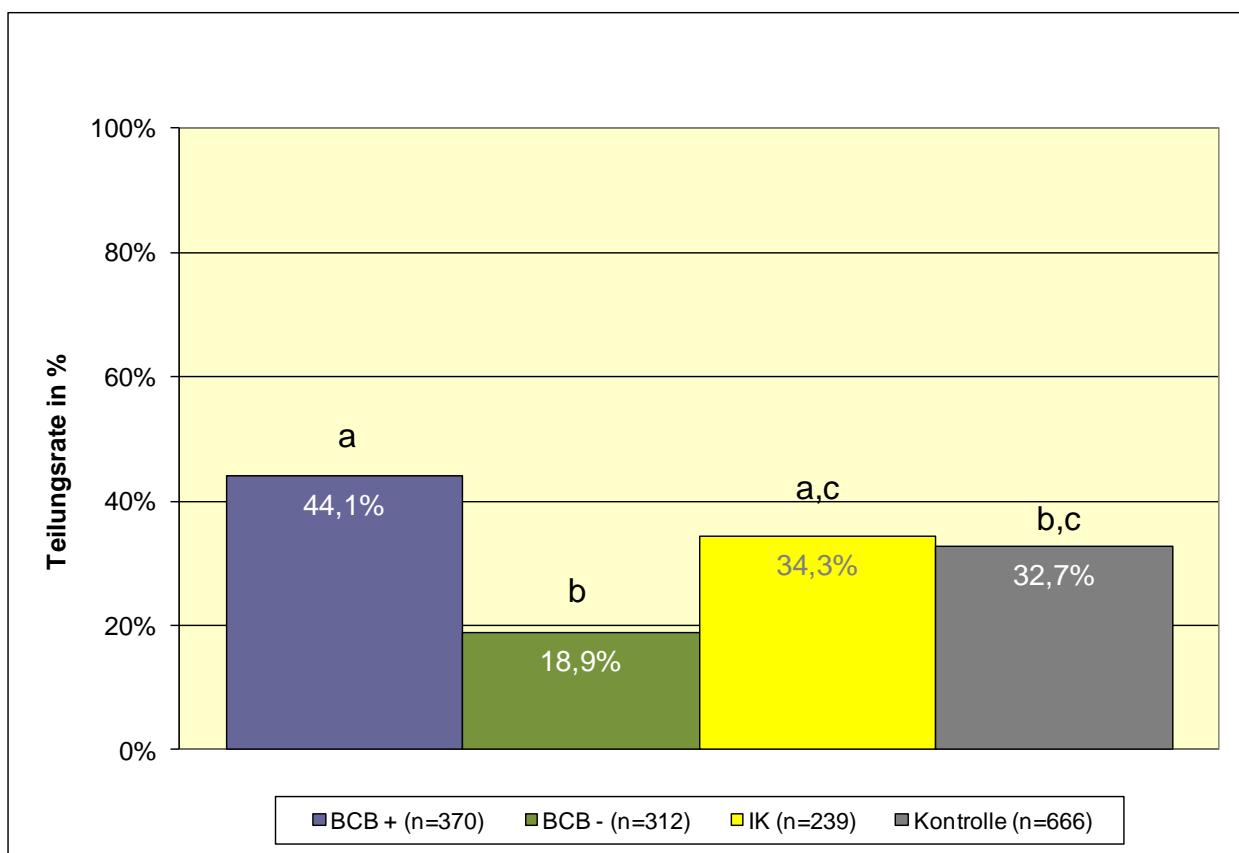
Ziel dieses Versuchsabschnittes war die Überprüfung der Eignung der BCB-Färbung zur Selektion feliner Oozyten für die IVP. Hierfür wurden 682 COK in BCB inkubiert und je nach Färbung des Ooplasmas in BCB+ und BCB- aufgeteilt. Im weiteren Verlauf wurde für jede Gruppe die Teilungs- und Blastozystenrate ermittelt. In der BCB+ Gruppe wurden 23, in der BCB- Gruppe 26, in der Gruppe der Inkubationskontrolle 18 und in der Kontrollgruppe 37 Wiederholungen durchgeführt.

4.1.1. Anteil der BCB+ und BCB- Oozyten

Von insgesamt 682 COK wurden 45,8%(N=312) als BCB- und 54,2%(N=370) als BCB+ klassifiziert. Bei drei Ansätzen wurden nur ungefärbte Oozyten (BCB-) beobachtet.

4.1.2. Teilungsrate

Abb. 12 Teilungsrate des ersten Versuchsabschnittes



Unterschiedliche Buchstaben p < 0,05

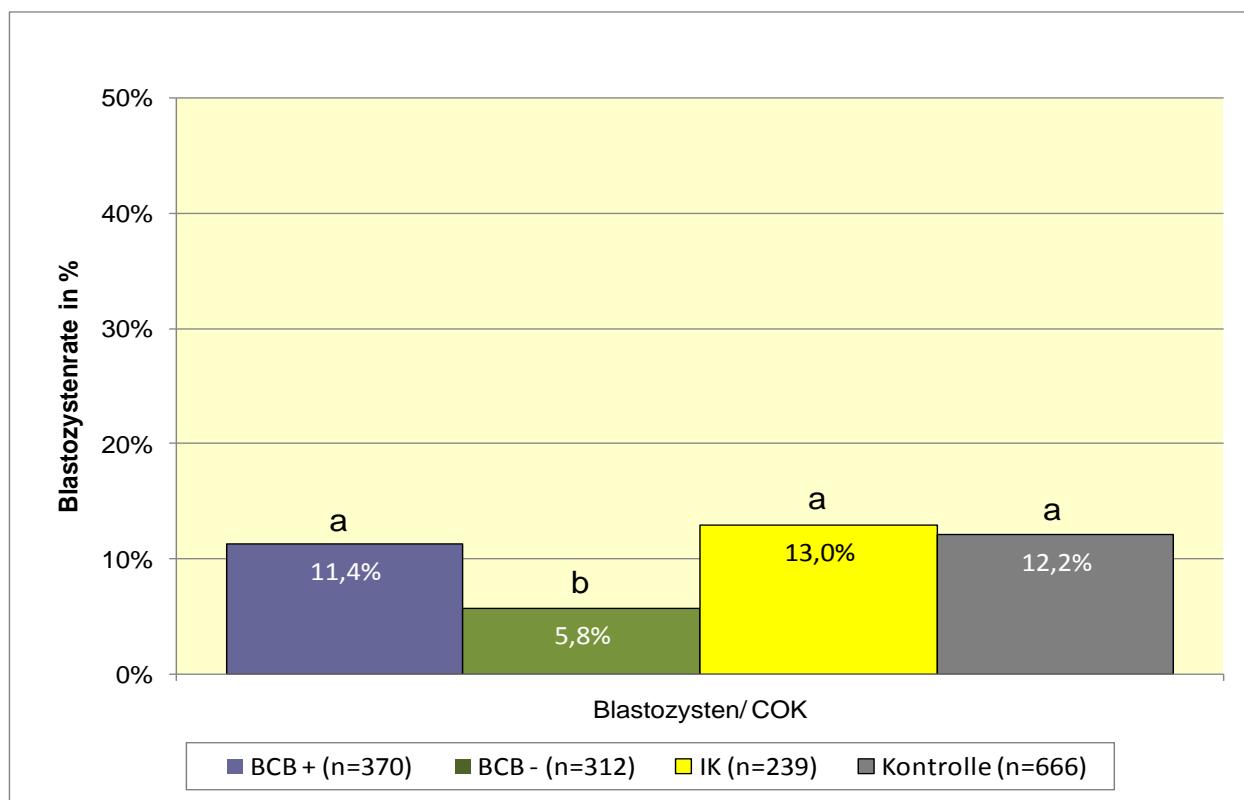
Neben den 682 COK der Färbegruppe wurden gleichzeitig 239 COK als Inkubationskontrolle und 666 COK als Kontrolle fertilisiert und bis zum Tag 9 kultiviert. Bei einer Gesamtzahl von 1587 COK wurden am Tag 3 522 COK (32,9%) als geteilt beurteilt.

Bei den BCB+ Oozyten (44,1%) konnte eine signifikant höhere Teilungsrate als bei den BCB- Oozyten (18,9%) sowie den Oozyten der Kontrollgruppe (32,7%) festgestellt werden. Die Teilungsrate der Oozyten der Inkubationskontrolle (34,3%) war signifikant höher zur Teilungsrate der BCB- Oozyten. Zwischen den Teilungsraten der beiden Kontrollgruppen bestand kein signifikanter Unterschied (Abb. 13).

4.1.3. Blastozystenrate

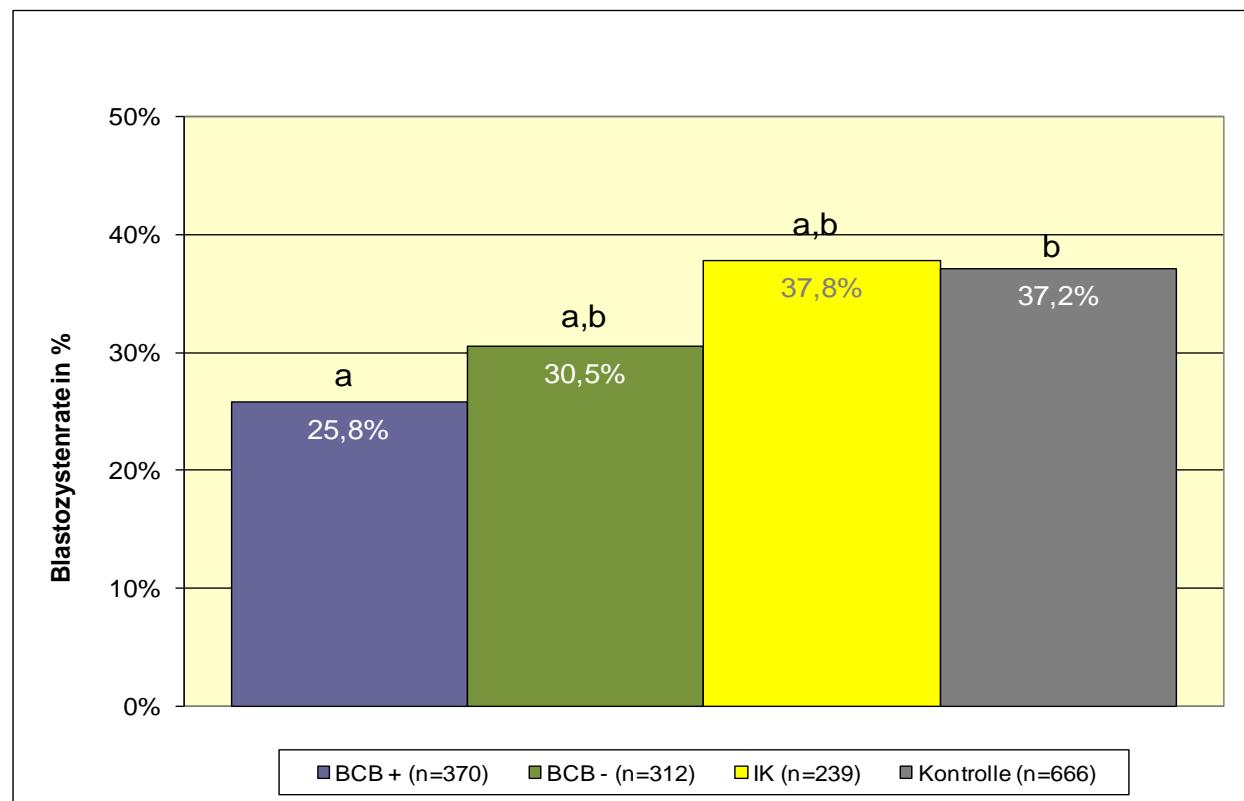
Die Blastozystenrate wurde am Tag 7, 8 und 9 post fertilisationem beurteilt. Die Beurteilung der Blastozysten erfolgte nach den Richtlinien der IETS (International Embryotransfer Society). Bei der Gesamtzahl von 1587 COK betrug die Blastozystenrate 10,9% bezogen auf die Anzahl der verwendeten COK bzw. 32,9% bezogen auf die Teilungsrate. Bezogen auf die Gesamtzahl der verwendeten COK (BCB+: n=370, BCB-: n= 312) zeigten die BCB+ Oozyten eine Blastozystenrate von 11,4% und die BCB- Oozyten eine Blastozystenrate von 5,8%. Dieser Unterschied in der Blastozystenrate war signifikant (Abb. 13). Es konnte kein signifikanter Unterschied zwischen der Blastozystenrate der BCB+ Oozyten und den beiden Kontrollgruppen (IK: 13%, K: 12,2%) festgestellt werden. Die Blastozystenraten der Kontrollgruppen waren jedoch signifikant höher als die Blastozystenrate der BCB- Oozyten. Wurde die Blastozystenrate auf die geteilten Oozyten bezogen (Abb. 14), zeigte sich lediglich ein signifikanter Unterschied in der Blastozystenrate zwischen BCB+ Oozyten und der Kontrollgruppe (BCB+: 25,8%, K: 37,2%).

Abb. 13 Blastozystenrate des ersten Versuchsabschnittes



a:b $p < 0,05$

Abb. 14 Blastozystenrate/ geteilte Eizellen des 1. Versuchsabschnittes



a:b $p < 0,05$

4.2. Einfluss des Alters der Spenderkatzen auf die IVP

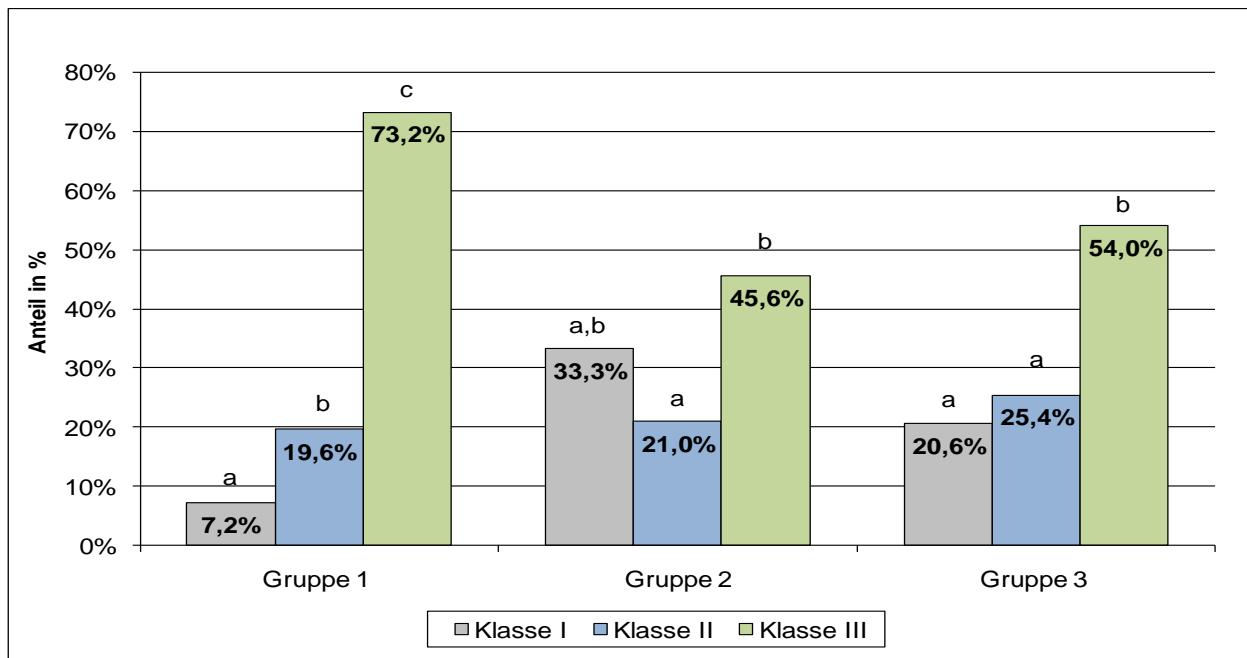
Beim zweiten Versuchsabschnitt wurden die Spenderkatzen in drei Altersgruppen aufgeteilt. Altersgruppe 1 enthielt die Oozyten der Spenderkatzen bis 9 Monate. In die Altersgruppe 2 wurden die Oozyten der Spendertiere, die älter als 9 Monate und jünger als 24 Monate waren, zugeordnet. Oozyten von Spenderkatzen, die älter als 24 Monate waren, wurden in die Altersgruppe 3 eingeteilt. In allen Altersgruppen wurden die Oozyten nach COK-Klassen I-III (s. Tab. 1) getrennt der IVP unterzogen. Insgesamt wurden 258 Oozyten verwendet. Davon entfielen 138 Oozyten auf die Altersgruppe 1, 57 Oozyten auf die Altersgruppe 2 und 63 Oozyten auf die Altersgruppe 3. Die Zahl der Wiederholungen in den Altersgruppen 1,2 und 3 betrug 5,3 bzw. 5.

4.2.1. Anteil der verschiedenen COK-Klassen innerhalb einer Altersgruppe

Abb. 16 zeigt die Anteile der verschiedenen COK-Klassen in den einzelnen Altersgruppen. Bei den Spenderkatzen aller Altersgruppen wurde der größte Anteil der COK der COK-Klasse III zugeordnet. Bei den Spenderkatzen der Gruppe 1 lag der Anteil an Klasse III COK bei 73,2% und war damit höher als die Anteile an Klasse I und II zusammen.

Die Unterschiede zwischen den einzelnen COK-Klassen waren in dieser Gruppe alle signifikant. Bei den COK der Gruppe 2 war lediglich der Unterschied zwischen Klasse II und III signifikant. Die Spendertiere der Gruppe 3 wiesen einen signifikant höheren Anteil an Klasse III COK im Vergleich zu den Klassen I und II auf (54% zu 20,6% bzw. 25,4%). Im Vergleich der Altersgruppen untereinander ist der Anteil an Klasse III COK in der Altersgruppe 1 signifikant höher als in den Gruppen 2 und 3.

Abb. 15 Anteil der verschiedenen COK-Klassen innerhalb einer Altersgruppe



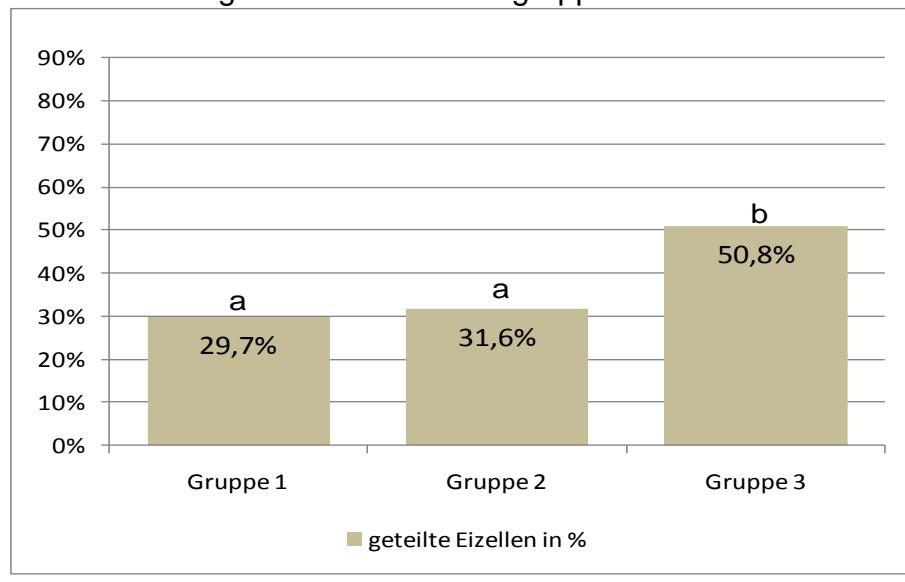
Unterschiedliche Buchstaben $p < 0,05$

4.2.2. Vergleich der Altersgruppen ohne Berücksichtigung der COK-Klassen

Teilungsrate

Die Teilungsrate war in der Altersgruppe 3 mit 50,8% signifikant höher als in den anderen Altersgruppen (Abb. 16).

Abb. 16 Teilungsraten in den Altersgruppen

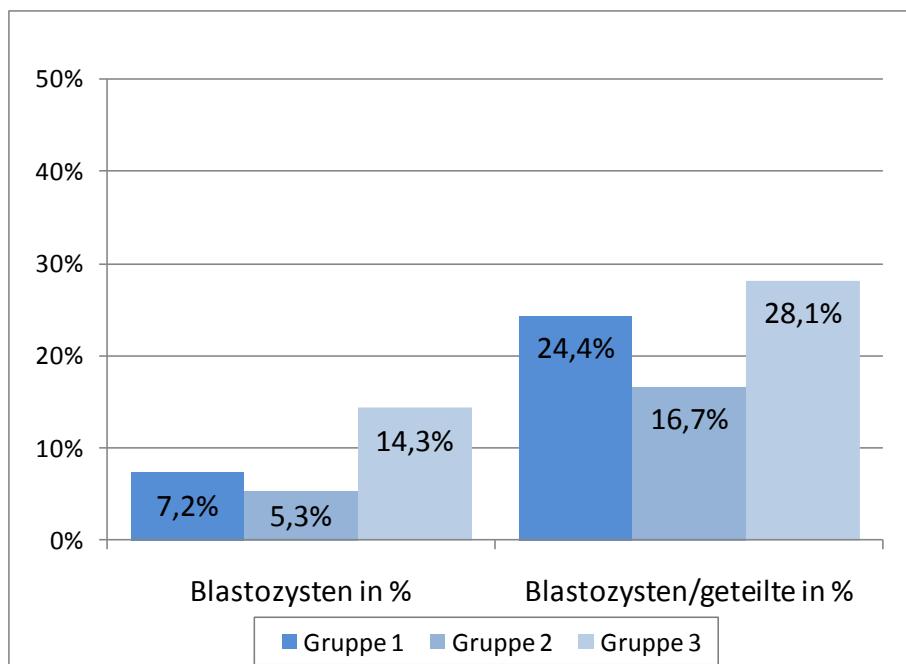


a:b $p < 0,05$

Blastozystenrate

Anschließend erfolgte die Ermittlung der Blastozystenrate zunächst für die Gesamtzahl der COK und dann bezogen auf die geteilten Eizellen, für jede Altersgruppe getrennt (s. Abb. 17). Hier ergaben sich keine Signifikanzen.

Abb. 17 Blastozystenraten in den Altersgruppen bezogen auf die Gesamtzahl und geteilten Oozyten



Die Blastozystenraten bezogen auf die Gesamtzahl der COK schwankten zwischen 5,3% (Gruppe 2), 7,2% (Gruppe 1) und 14,3% (Gruppe 3). Bezogen auf die Teilungsrate wurde eine Blastozystenrate von 16,7% (Gruppe 2), 24,4% (Gruppe 1) und 28,1% (Gruppe 3) erreicht. Die Unterschiede bei beiden Vergleichen waren nicht signifikant.

4.2.3. Vergleich der Altersgruppen mit Berücksichtigung der COK-Klassen

Teilungsrate

Zunächst wurden die Teilungsraten zwischen den Klassen innerhalb einer Altersgruppe verglichen (Abb. 18). Die höchste Teilungsrate (48,1%) wurde in der Altersgruppe 1 bei den Oozyten der Klasse II beobachtet. Dieser war signifikant höher als bei den Oozyten der Klasse III. Bei den Katzen im Alter zwischen 10 und 24 Monaten (Gruppe 2) gab es keine signifikanten Unterschiede bezüglich der Teilungsraten der verschiedenen COK-

Klassen. In der Altersgruppe 3 (>24 Monate) wiesen die COK der Klasse I eine Teilungsrate von 84,6% auf. Die niedrigste Teilungsrate wurde mit den COK der Klasse III erzielt (35,3%; $p < 0,05$). Beim Vergleich der Teilungsraten der COK-Klassen bezogen auf die Altersgruppen ergab sich nur eine Signifikanz bei der Altersgruppe 1, bei den Klassen II und III (36,8% zu 84,6%) und I und III (40% zu 84,6%). Der Vergleich der Klassen I und II war nicht signifikant. Bei den Vergleichen innerhalb der Gruppen 2 und 3 ergaben sich keine Signifikanzen.

Abb. 18 Teilungsraten der COK-Klassen innerhalb der Altersgruppen

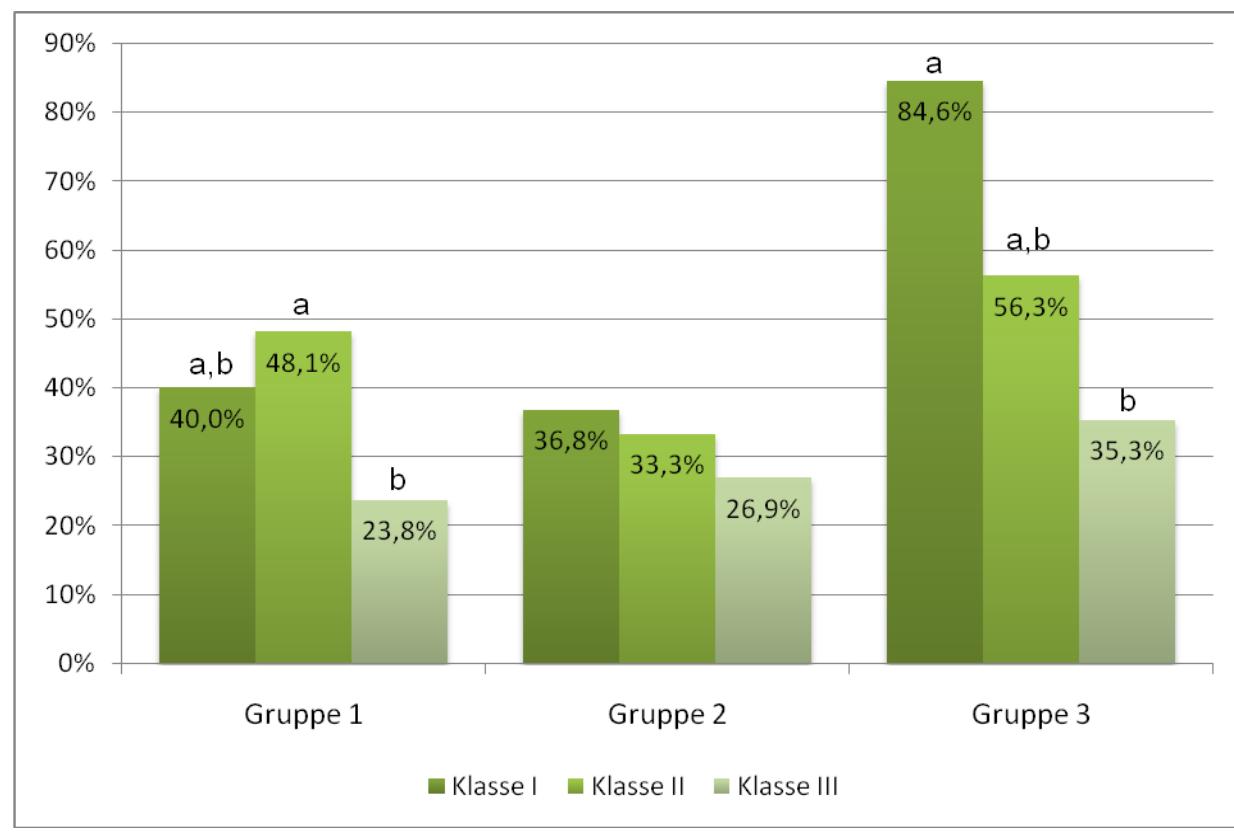
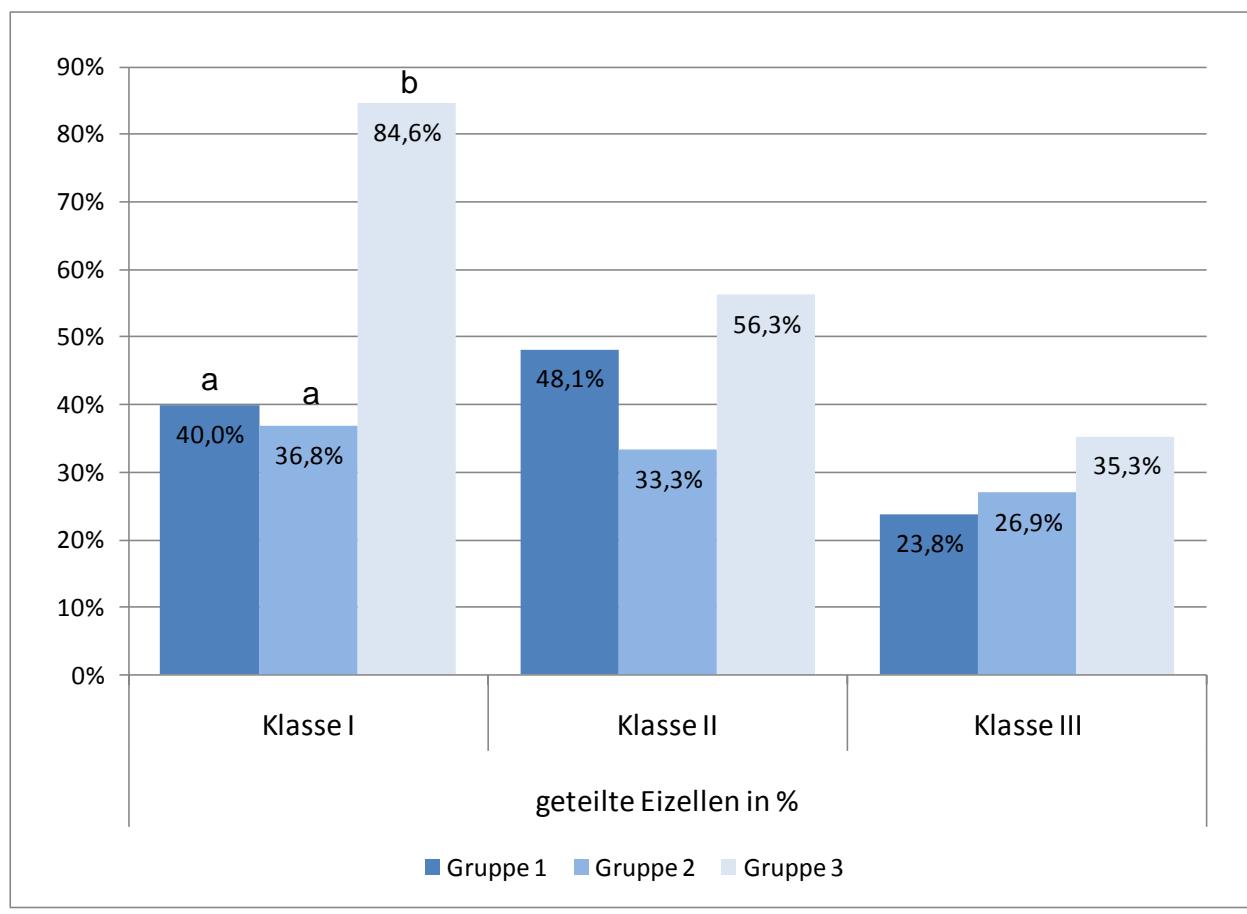


Abb. 19 Teilungsraten der Altersgruppen innerhalb der COK-Klassen



a:b $p < 0,05$

Blastozystenrate

Bei der Betrachtung der Blastozystenrate bezogen auf die Gesamtzahl der COK wurden Raten zwischen 0% und 25% ermittelt. Bezogen auf die Teilungsraten ergaben sich Blastozystenraten zwischen 0% und 50%. Aufgrund der geringen Anzahl an Blastozysten waren die ermittelten Unterschiede nicht signifikant bzw. nicht statistisch auswertbar.

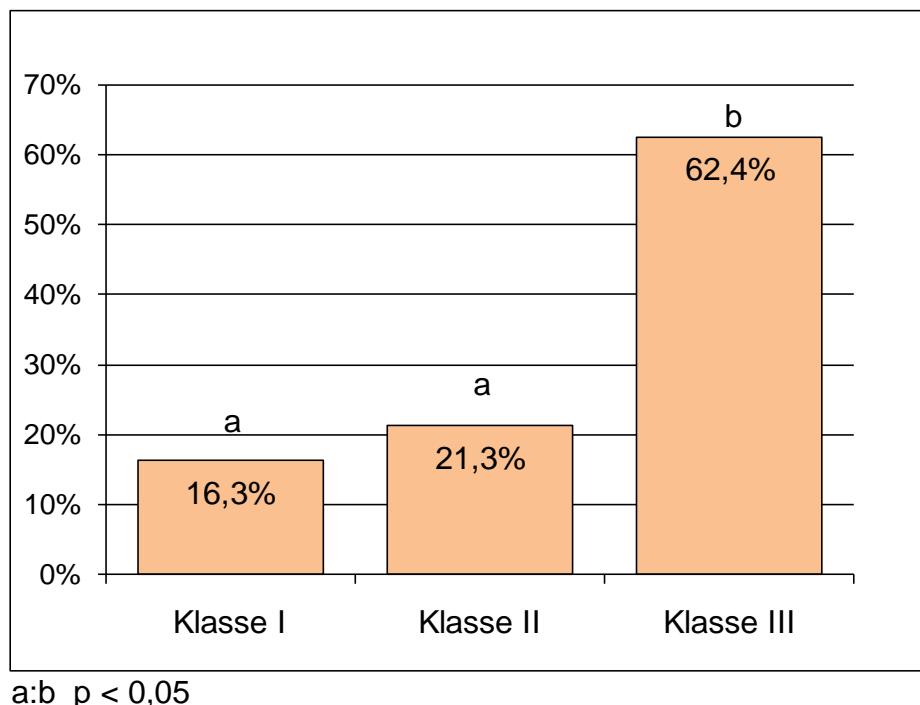
4.3. Einfluss der verschiedenen COK-Klassen

In diesem Abschnitt soll der Einfluss der verschiedenen COK-Klassen ohne Berücksichtigung des Alters der Spenderkatze auf das Ergebnis einer IVP überprüft werden.

4.3.1. Anteil der verschiedenen COK-Klassen

Von insgesamt 258 COK wurden 16,3% (n=42) als Klasse I klassifiziert, 21,3% (n=55) als Klasse II und 62,4% (n=161) als Klasse III (Abb. 20). Es wurde somit ein signifikant höherer Anteil an COK der Klasse III gewonnen.

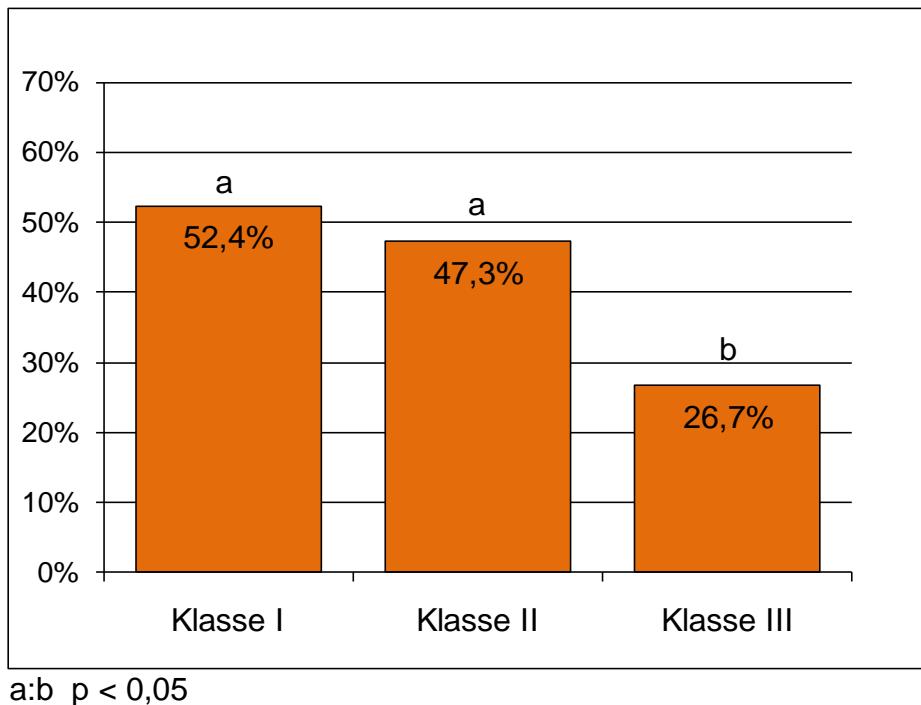
Abb. 20 Verteilung der COK-Klassen



4.3.2. Teilungsrate in den verschiedenen COK-Klassen

Am Tag 3 post fertilisationem zeigten die Oozyten (Abb. 21) der Klasse I (52,4%, 22/42) und Klasse II (47,3%, 26/55) eine signifikant höhere Teilungsrate im Vergleich zu den Oozyten der Klasse III (26,7%, 43/161).

Abb. 21 Teilungsrate in den verschiedenen COK-Klassen



4.3.3. Blastozystenraten in den verschiedenen COK-Klassen

Tab. 2 Blastozystenraten in den verschiedenen COK-Klassen

Klasse	Anzahl COK/Blastozyste	Blastozystenrate/COK (%)	Blastozystenrate/geteilte Eizellen (%)
I	42/4	9,5	18,2
II	55/7	12,7	26,9
III	161/1	6,8	25,6

Beim Vergleich der Blastozystenraten der verschiedenen COK-Klassen konnte kein signifikanter Unterschied festgestellt werden. Bei der Betrachtung der absoluten Zahlen der Blastozystenrate bezogen auf die Gesamtzahl an COK konnte eine erhöhte Blastozystenrate der Oozyten der Klasse II beobachtet werden.

5. Diskussion

Die Ergebnisse der In vitro Produktion von Embryonen (IVP) bei der Hauskatze, lassen sich auf wildlebende Großkatzen übertragen. So dient die Hauskatze als Modelltier für die Reproduktionstechniken bei den Großkatzen, die damit zur Erhaltung von Genmaterial von gefährdeten Großkatzen beitragen können. Bei der sehr gut etablierten IVP boviner Embryonen konnte bereits in mehreren Studien gezeigt werden, dass die Eizellqualität eine entscheidende Rolle für den Erfolg einer IVP spielt. Auch bei der Katze wird jetzt intensiv im Bereich der Entwicklungskompetenz von Eizellen gearbeitet. Unter anderem sollen nicht invasive Methoden für die Selektion von Oozyten etabliert werden. Eine Selektion Entwicklungskompetenter Oozyten könnte zu einer Erhöhung der Blastozystenrate nach einer IVP beitragen.

Die BCB-Färbung hat sich inzwischen zur Beurteilung der Entwicklungskompetenz von Oozyten bewährt. Es liegen hierzu bereits Untersuchungen an Oozyten verschiedener Spezies vor, so z.B. beim Rind (Pujol et al. 2000, Pujol et al. 2004, Alm et al. 2005, Bhojwani et al. 2007, Torner et al. 2008), beim Büffel (Manjunatha et al. 2007), bei der Ziege (Rodriguez-Gonzales et al. 2002, Rodriguez-Gonzales et al. 2003, Urdaneta et al. 2003), beim Schwein (Ericson et al. 1993, Roca et al. 1998, Wongsrikeao et al. 2006), beim Hund (Rodrigues et al. 2009), beim Pferd (Mlodawska et al. 2005) und bei der Maus (Wu et al. 2007).

In der vorliegenden Arbeit sollte im ersten Versuchsabschnitt die BCB-Färbung im Hinblick auf die Selektion kompetenter feliner Oozyten überprüft werden. Zunächst wurden, ohne Berücksichtigung des Alters der Spenderkatzen, COK mit BCB inkubiert, danach in vitro maturiert, fertilisiert und bis zum Tag 9 nach der IVF kultiviert.

Der BCB-Test ermöglicht die Bestimmung der Aktivität des Enzyms G6PDH. G6PDH ist ein Enzym des Pentosephosphatweges und ist aktiv in wachsenden Oozyten (Maus: Mangia und Epstein 1975). Oozyten, die ihre Wachstumsphase beendet haben, zeigen einen Abfall der G6PDH-Aktivität. Nach Inkubation von Cumulus-Oozyten-Komplexen in BCB wird in Oozyten mit aktiver G6PDH der Farbstoff entfärbt (Schwein: Ericsson et al. 1993). Bei Oozyten, denen das aktive Enzym fehlt, ist diese Entfärbung nicht möglich und die Oozyten behalten nach ihrer Inkubation ein blaues Ooplasma. Wachsende

Oozyten zeigen eine schlechtere Entwicklungskompetenz im Rahmen einer IVP als Oozyten, die ihre Wachstumsphase bereits abgeschlossen haben. (Rind: Hyttel et al. 1997).

Die bereits vorliegenden Studien bei anderen Spezies konnten nachweisen, dass sich die BCB-Färbung nicht negativ auf die Vitalität der behandelten Oozyten auswirkt. Manjunatha et al. (2007) haben in ihrer Studie mit Büffeloozyten die Eignung verschiedener Konzentrationen von BCB überprüft. Die Oozyten wurden mit einer Konzentration von 13 μ M BCB, 26 μ M BCB und 39 μ M BCB inkubiert. Im Ergebnis hat sich gezeigt, dass es einen Anstieg der Blastozystenrate bei einer Erhöhung der BCB-Konzentration bis 26 μ M gab. Eine weitere Erhöhung der Konzentration führte zu einem Abfall der Blastozystenrate. In einer Studie von Tiffin et al. 1991 an Rinderoozyten wurde ebenfalls nachgewiesen, dass die Verwendung einer Konzentration von 26 μ M BCB am effektivsten ist. Bei Rodriguez-Gonzales et al. (2002) wurden Untersuchungen an Ziegenoozyten zu verschiedenen Konzentrationen von BCB durchgeführt. Auch hier zeigte sich, dass eine Konzentration über 26 μ M eher zu einer Abnahme der Embryonenrate führt. Aufgrund dieser Ergebnisse wurde bei der vorliegenden Studie eine Konzentration von 26 μ M BCB verwendet.

Im ersten Schritt wurde das Verhältnis von BCB+ und BCB- Oozyten ermittelt. Von insgesamt 682 COK waren 54,2% BCB+ und 45,8% BCB-. Der in dieser Arbeit ermittelte Anteil an BCB+ Oozyten ist mit den ermittelten Werten anderer Arbeiten vergleichbar. Alm et al. (2005) konnten in ihren Untersuchungen an Rinderoozyten einen Anteil von 57,9% BCB+ Oozyten beobachten. Bhojwani et al. (2007) erhielten in ihrer Studie mit Rinderoozyten einen Anteil von 59,4% BCB+ Oozyten. Ähnliche Ergebnisse wurden beim Büffel (Manjunatha et al. 2007: 57,2% BCB+) und beim Schwein (Ishizaki et al. 2009: 65,2% BCB+) erzielt. Bei Mlodawska et al. (2007) waren die Ergebnisse bei Untersuchungen mit Pferdeoozyten unterschiedlich je nach COK Klasse und Follikelgröße. Katska-Ksiazkiewicz et al. (2007) erhielten bei Untersuchungen mit Oozyten von adulten Ziegen 85,6% BCB+ Oozyten. Zusammenfassend kann gesagt werden, dass in den meisten Studien ein Anteil von 50-80% der Oozyten als BCB+ selektiert wurde. Interessant ist hierbei, dass meistens bereits nach morphologischen Kriterien selektierte COK für die BCB-Färbung verwendet wurden. Dennoch findet sich nach der BCB-Färbung ein hoher Prozentsatz an Oozyten

mit geringerer Entwicklungskompetenz (BCB-). Die Ergebnisse der Studien zeigen, dass die Selektion der Oozyten nach morphologischen Kriterien allein nicht ausreichend ist und unterstreicht den heterogenen Charakter von Eizellen, die aus Follikeln verschiedener Größe und Entwicklungsstand gewonnen wurden. Auch in der vorliegenden Studie findet sich dieses Phänomen. Obwohl nur nach morphologischen Kriterien geeignete Oozyten verwendet wurden, werden 45,8% der Oozyten nach der BCB-Färbung als „ungeeignet“ selektiert.

Ein höherer Anteil BCB- Oozyten konnte in Studien mit präpubertären Oozyten beobachtet werden. Rodriguez-Gonzalez et al. (2002) haben eine Studie mit präpubertären Ziegen durchgeführt und erhielten 30,1% BCB+ Oozyten und 69,9% BCB- Oozyten. Tagawa et al. (2007) erhielten in ihrer Studie mit Kälberoozyten 65,6% BCB- Oozyten. Bei präpubertären Oozyten bestätigt die BCB-Färbung somit die schlechtere Entwicklungskompetenz im Vergleich zu adulten Oozyten.

In der vorliegenden Studie konnte eine signifikant höhere Teilungsrate in der Gruppe der BCB+ Oozyten beobachtet werden. Für die Teilungsrate ergaben sich signifikante Differenzen zwischen BCB+ und BCB-, BCB+ und Kontrollgruppe und zwischen BCB- und die Inkubationskontrolle. Ähnliche Ergebnisse finden sich auch bei anderen Spezies (Rind: Opiela et al. 2008; Büffel: Manjunatha et al. 2007; Schwein: Ericsson et al. 1993, Roca et al. 1998, Wongsrikeao et al. 2006; Ziege: Rodriguez-Gonzalez et al. 2003, Katska-Ksiazkiewicz et al. 2007). Einige Arbeitsgruppen konnten hingegen keine höhere Teilungsrate bei BCB+ Oozyten im Vergleich zu BCB- Oozyten nachweisen (Rind: Alm et al. 2005, Torner et al. 2008; Ziege: Rodriguez-Gonzalez et al. 2002; Schwein: Ishizaki et al. 2009).

In allen bisher vorliegenden BCB-Studien findet sich eine höhere Blastozystenrate bei den BCB+ Oozyten im Vergleich zu BCB-. Diese Ergebnisse lassen sich auch bei der vorliegenden Studie an Katzeneizellen für die Blastozystenrate (bezogen auf die Anzahl der COK) nachweisen. Die BCB-Färbung ist demnach auch für die Selektion Entwicklungskompetenter feliner Oozyten geeignet. Allerdings zeigt sich auch in der vorliegenden Arbeit das Phänomen, dass BCB+ Oozyten zwar eine signifikant höhere Blastozystenrate als die BCB- Oozyten zeigen und somit eine höhere Entwicklungskompetenz aufweisen, allerdings fehlt ein Anstieg der allgemeinen

Blastozystenrate (Bols et al. 2007). Bei allen Spezies gelang es nicht, die allgemeine Blastozystenrate, die bei einer IVP bisher erzielt wird, zu steigern.

Die Selektion von Eizellen mittels BCB-Färbung kann einen wichtigen Beitrag zum besseren Verständnis der Entwicklungskompetenz von Eizellen leisten. Hierzu wurde in einigen Studien versucht, die BCB+ Oozyten verschiedener Spezies genauer zu klassifizieren. Dies ist ein interessanter Ansatz zur weiteren Aufklärung geeigneter Parameter für die Beurteilung der Entwicklungskompetenz von Oozyten. Rodriguez-Gonzalez et al. (2002) haben bei Untersuchungen mit Ziegenoozyten festgestellt, dass ein höherer Anteil von BCB+ Oozyten die Metaphase II erreicht als BCB- Oozyten und unbehandelte Oozyten. Die unterschiedliche Kinetik der Kernreifung bei BCB+ und BCB- Oozyten wird ebenfalls von weiteren Studien bestätigt (Rind: Alm et al. 2005; Schwein: Egerszegi et al. 2010; Büffel: Manjunatha et al. 2007; Pferd: Mlodawska et al. 2005; Ziege: Rodriguez-Gonzalez et al. 2002). Torner et al. (2008) untersuchten bovine BCB-selektierte Oozyten auf molekularer und subzellulärer Ebene. Dabei zeigten BCB+ Oozyten eine signifikant höhere Phosphorylierung von Akt und MAP-Kinase (mitogen-activated protein) und wiesen eine hohe Expression von Genen der Translationsregulation, der Regulation des Zellzyklus sowie der Proteinbiosynthese auf. BCB- Oozyten zeichneten sich durch eine höhere mitochondriale Aktivität und nachweisbare Nucleoli im GV aus. Des Weiteren exprimierten BCB- Oozyten vor allem Gene der ATP-Synthese, des mitochondrialen Elektronentransportes und der Calciumbindung.

Neben der Überprüfung der Eignung der BCB-Färbung zur Selektion von Eizellen für die IVP gibt es weitere Ansätze zur Nutzung der BCB-Färbung. So untersuchten Bhojwani et al. (2007) die Eignung der BCB-Färbung zur Selektion von bovinen Oozyten für die Verwendung im Kerntransfer. Auch hier zeigten die BCB+ Oozyten eine bessere Entwicklungskompetenz.

Eine große Anzahl von Oozyten erreichen nach In vitro Maturation, Fertilisation und Kultivierung nicht das Blastozystenstadium. In vivo liegt der Anteil von felineen Oozyten, die nach der Befruchtung das 2-Zellstadium erreichen, bei 60-80% (Johnston et al. 1991b), In vitro hingegen nur bei ca. 25% (Wood et al. 1995). Sicherlich spielen

suboptimale Bedingungen bei der IVP eine Rolle. Die Medien und Zusätze werden meist in Anlehnung an die IVP beim Rind gewählt (Freistedt et al. 1999).

Bei der Betrachtung der Ergebnisse dieser Arbeit im Vergleich zu anderen Studien zur IVP bei der Katze wird deutlich, dass die erzielten Teilungs- und Blastozystenraten im unteren Bereich liegen. Als Ursache für die geringen Raten kommen verschiedene Aspekte in Betracht. Zum einen könnte der saisonale Zeitpunkt der Gewinnung der COK einen Einfluss auf die Teilungs- und Blastozystenrate haben. In der vorliegenden Studie erfolgte die Gewinnung der über das gesamte Jahr hinweg, so dass saisonale Einflüsse nicht berücksichtigt werden konnten. Bei einigen Studien zur IVP bei der Katze erfolgte die Gewinnung der COK nur zu eingegrenzten Jahreszeiten. Bei Freistedt et al. (2001a) wurden bei der IVF vier Saisonzeiten unterschieden (Jan.- Mär., Apr.-Jun., Jul.-Sep. und Okt.-Dez.). Die Teilungsraten waren im Zeitraum von Apr. – Jun. und Jul.-Sep. signifikant höher (53,1% und 54,6%). Die Blastozystenrate war in der Saison von Oktober bis Dezember mit 23,6% signifikant niedriger als bei den Zeiten von Jan. – Sep. Bei Karja et al. (2002) wurden die Oozyten nur im Zeitraum April bis Juni gewonnen. Die Teilungsrate lag hier bei 65% und die Embryonenrate bei 32%. Dies könnte zu dem Schluss führen, dass bei der Katze saisonale Einflüsse auf Teilungs- und Blastozystenrate vorliegen.

Im zweiten Abschnitt dieser Studie wurde der Einfluss des Alters der Spenderkatzen auf die Teilungs- bzw. Blastozystenrate untersucht. Beim ersten Versuchsabschnitt stammte ein großer Teil der Ovarien zur Eizellgewinnung aus Kastrationen des Münchener Tierschutzvereins. Da es sich hierbei meist um Fundkatzen handelte, war das Alter der Spenderkatzen oft nicht bekannt. Aus diesem Grund konnte dieser Parameter im ersten Versuchsteil nicht erfasst werden.

Im zweiten Versuch konnte eine Unterteilung in drei Altersgruppen vorgenommen werden. In der Altersgruppe 1 wurden die Spendertiere bis zu einem Alter von neun Monaten (präpubertäre Tiere) erfasst. Die Altersgruppe 2 umfasst die Spendertiere im Alter von 10 bis 24 Monaten. In die Altersgruppe 3 wurden die Tiere zusammengefasst, die zum Kastrationszeitpunkt älter als 24 Monate waren. Auch bei anderen Studien mit felinen Oozyten wurde versucht, Unterschiede im Bezug auf die Eizellqualität bei präpubertären und adulten Spendertieren zu erfassen. Bei Martins et al. (2009) wurden

die Oozyten nach der Maturation fixiert und die Ultrastruktur elektronenmikroskopisch untersucht. Es zeigte sich, dass nur die Oozyten der Gruppe der adulten Tiere eine ansteigende Zahl an Mikrovilli aufwies. Eine hohe Zahl an Mikrovilli bedeutet eine größere Entwicklungskompetenz. Bei den Oozyten von präpubertären Spenderkatzen war der Anteil von Mikrovilli wesentlich geringer.

Im zweiten Versuchsabschnitt wurden auch die Anteile der verschiedenen COK-Klassen in den einzelnen Altersgruppen erfasst. Bei allen Altersgruppen war der Anteil an COK der Klasse III (wenig Cumulus oophorus, inhomogenes Ooplasma) am größten. Der mit 73,2 % signifikant höchste Anteil wurde in der Altersgruppe 1 (jünger als 9 Monate) beobachtet. Dies könnte bedeuten, dass die Oozyten von präpubertären Tieren über eine geringere Entwicklungskompetenz verfügen. Dies kann auch die geringe Blastozystenrate im ersten Versuchsteil erklären, bei dem wahrscheinlich viele präpubertäre Spenderkatzen verwendet wurden.

Bei der Betrachtung der Teilungsrate zeigte sich, dass die Teilungsrate der COK der Altersgruppe über 2 Jahren mit 50,8% signifikant höher war, als die Teilungsrate der andern Altersgruppen. In einer Studie, bei der nur adulte Tiere verwendet wurden (Karja et al. 2002a), wurden mit einer Teilungsrate von 65,1% und einer Embryonenrate von 32% sehr gute Ergebnisse erzielt. Damit liegt die Vermutung nahe, dass die Oozyten adulter Spenderkatzen eine größere Entwicklungskompetenz besitzen. Bei verschiedenen Spezies gibt es auch schon Untersuchungen zum Zusammenhang zwischen dem Alter der Spendertiere und der Teilungs- bzw. Blastozystenrate. Pujol et al. (2004) haben die Entwicklungskompetenz von Oozyten der Färse im Vergleich zu denen des Rindes untersucht und dabei festgestellt, dass die Oozyten von adulten Kühen eine größere Kompetenz für die IVP hatten, als die Färsenoozyten der Kontrollgruppe. Wiederholt wurde festgestellt, dass Oozyten von Kälbern und Lämmern weniger Entwicklungskompetent sind, als die von adulten Tieren (O'Brien et al. 1996, Khatir et al. 1998, Revel et al. 1995).

In den Studien zur IVP bei der Katze variiert die Blastozystenrate zwischen 10 – 50% (Wolfe und Wildt 1996, Wood und Wildt 1997, Pope et al. 1997, Freistedt et al. 1999, Swanson et al. 1999). Die hier im Versuch ermittelten Blastozystenraten liegen unter den in anderen Studien erzielten Ergebnissen. Eine mögliche Ursache der geringen

Teilungs- und Blastozystenrate könnte in der Qualität des verwendeten Spermazellen liegen. Für die IVF bei der Katze wird Sperma unterschiedlicher Herkunft verwendet. Einige Studien verwenden Sperma, das durch Elektroejakulation bzw. durch Verwendung einer künstlichen Scheide gewonnen wurde. Diese Ejakulate besitzen meist eine gute Qualität hinsichtlich Konzentration und Motilität. Swanson et al. (1996) erzielten in ihrer Studie mit Sperma, das durch Elektroejakulation gewonnen wurde, eine Teilungsrate von ca. 80% und eine Blastozystenrate von ca. 30% (je nach Art des verwendeten Mediums). Comizzoli et al. (2006) nutzen für die IVF Sperma, das nach Elektroejakulation gewonnen wurde und erreichten eine Blastozystenrate von 21%. Wood und Wildt (1997) erreichten mit Sperma, das mit Hilfe einer künstlichen Vagina gewonnen wurde, eine Teilungsrate von 18% und eine Blastozystenrate von ca. 10%. Gomez et al. (2000) haben bei ihrer Studie Sperma, das durch eine künstliche Vagina gewonnen wurde, für das Verfahren der intrazytoplasmatischen Spermieninjektion (ICSI) verwendet. Sie erhielten eine Teilungsrate von 60,3 % und eine Blastozystenrate von 22,9%.

In der vorliegenden Studie wurde Nebenhodensperma aus den Organen kastrierter Kater verwendet. Dies weist in der Regel eine schlechtere Ausgangsqualität im Vergleich zu den anderen Gewinnungsmethoden auf. Außerdem musste das gewonnene Nebenhodensperma zur besseren Verfügbarkeit kryokonserviert werden. Die Kryokonservierung führte zu einer weiteren Abnahme der Spermaqualität. Ein weiterer Grund für die schlechtere Qualität des verwendeten Spermazellen könnte das Alter der Spenderkater sein, da meist sehr junge Kater kastriert wurden. In Studien in denen Nebenhodensperma kastrierter Kater verwendet wurde, wurden teilweise sehr hohe Teilungsraten erzielt (60%: Pope et al. 2006; 60%: Comizzoli et al. 2006; 80%: Bogliolo et al. 2001, Karja et al 2002; 65,1%), die erzielten Blastozystenraten liegen aber teilweise in einem ähnlichen Bereich wie in den eigenen Arbeiten. Bei einer Studie mit ICSI mit Nebenhodensperma erhielten Bogliolo et al. (2001) eine Teilungsrate von 82,2 % und eine Blastozystenrate von 6,6%. Zur besseren Beurteilung dieser Ergebnisse wäre ein Vergleich des Alters der verwendeten Kater interessant, dies wird aber in der Regel in den Studien nicht angegeben.

Ein weiteres Problem bei der IVF von felineen Oozyten liegt darin, dass für jeden Versuchsansatz häufig unterschiedliche Ejakulat verwendet werden müssen. Dadurch ergeben sich Schwankungen zwischen den einzelnen Wiederholungen. In der bovinen

IVF besteht dieses Problem nicht, da hier für die einzelnen Wiederholungen jeweils das gleiche Ejakulat eines vorher getesteten Bullen verwendet wird.

Schlussfolgerung:

Zusammenfassend kann festgestellt werden, dass die BCB-Färbung für die Selektion kompetenter Oozyten bei der Katze geeignet ist. Eine Nutzung nur von adulten Oozytenspendern, eine weitere Optimierung der Kulturbedingungen und die Verwendung geeigneter Samenspender kann zu besseren Ergebnissen beitragen.

6. Zusammenfassung

Es sollte untersucht werden, ob bei der Katze mit Hilfe der Brillantcresylblau-Färbung (BCB) entwicklungskompetente Oozyten für die In-Vitro-Produktion selektiert werden können. Zusätzlich wurde der Einfluss des Alters der Spenderkatzen auf die Teilungs- bzw. Blastozystenrate der Eizellen untersucht.

Im ersten Versuchsabschnitt standen 1587 Cumulus-Oozyten-Komplexe (COK), die aus Ovarien nach Kastration von Katzen unbekannten Alters gewonnen wurden, zur Verfügung. Zur Kontrolle des Inkubationseffekts vor der in vitro Maturation (IVM) wurden 239 COK für 90 Minuten in 0,4%igem BSA bei 38,5°C inkubiert und danach in vitro gereift, befruchtet und bis zu 8 Tage kultiviert. 682 COK wurden vor der IVM für 90 Min. bei 38,5°C mit 26µM BCB gelöst in DPBS + 0,4% BSA behandelt. BCB-positive (blaues Zytoplasma, niedriges G6PD) und BCB-negative Oozyten (farbloses Zytoplasma, höhere G6PD) wurden danach getrennt in vitro gereift, befruchtet und bis zu 8 Tage kultiviert. Als Kontrollgruppe wurden 666 COK direkt nach der Gewinnung in vitro gereift, befruchtet und bis zu 8 Tage kultiviert. Der Anteil der BCB+ Oozyten betrug 54,3%. BCB+ Oozyten wiesen am Tag 3 eine signifikant höhere Teilungsrate (bezogen auf alle Oozyten) als BCB- Oozyten (44,1% gegenüber 18,9%) auf. Oozyten der Kontrollgruppe hatten eine Teilungsrate von 32,7%. Oozyten der Inkubationskontrolle hatten eine signifikant höhere Teilungsrate (34,3%) als BCB- Oozyten. Die BCB+ Oozyten zeigten eine Blastozystenrate (bezogen auf die Gesamtzahl der COK) von 11,4% und die BCB- Oozyten eine Blastozystenrate von 5,8% (Differenz $p<0,05$). Es konnte kein signifikanter Unterschied zwischen der Blastozystenrate der BCB+ Oozyten und der Inkubationskontrolle (13%) oder der Kontrollgruppe (12,2%) festgestellt werden. Bei der Blastozystenrate, die auf die geteilten Oozyten bezogen wurde, zeigte sich ein signifikanter Unterschied zwischen BCB+ Oozyten und der Kontrollgruppe (25,8% gegenüber 37,2%).

Für den zweiten Versuch wurden nur Spendertiere mit bekanntem Alter zum Kastrationszeitpunkt verwendet. Gruppe 1 bestand aus präpubertären Spendertieren (< 9 Monate; 138 COK). Gruppe 2 umfasste COK (n = 57) von Spendertieren im Alter von

10 bis 24 Monaten. In Gruppe 3 wurden COK (n = 63) von Spendertieren verwendet, die zum Kastrationszeitpunkt älter als 24 Monate waren. Die COK (n = 258) wurden nach der Gewinnung morphologisch beurteilt und in 3 Klassen eingeteilt. Bei den präpubertären Tieren (Gruppe 1) lag der Anteil von COK in Klasse III (wenig Cumuluszellen, heterogenes Ooplasma) bei 73,2%. Dies war signifikant höher als die Anteile bei älteren Tieren (Gruppe 2 45,6%, Gruppe 3 54,0%).

Beim Vergleich der Altersgruppen mit Berücksichtigung der COK-Klassen wurde die höchste Teilungsrate (48,1%) in der Altersgruppe 1 bei den Oozyten der Klasse II beobachtet. Bei den Katzen bis 24 Monate (Gruppe 2) gab es keine signifikanten Unterschiede bezüglich der Teilungsraten der verschiedenen COK-Klassen. In der Altersgruppe 3 (>24 Monate) wiesen die COK der Klasse I eine Teilungsrate von 84,6% auf. Die niedrigste Teilungsrate wurde bei allen Altersgruppen mit den COK der Klasse III erzielt (35,3%; Differenz $p < 0,05$).

Die Blastozystenrate bezogen auf die Gesamtzahl der COK schwankte zwischen 0% und 25% in den verschiedenen Gruppen. Bezogen auf die Teilungsrate ergaben sich Blastozystenraten zwischen 0% und 50%. Aufgrund der geringen Anzahl an Blastozysten ergaben sich keine signifikanten Unterschiede zwischen den Gruppen bzw. den COK-Klassen.

Zusammenfassend kann festgestellt werden, dass die BCB-Färbung für die Selektion kompetenter Oozyten bei der Katze geeignet ist. Eine Nutzung nur von adulten Oozytenspendern, eine weitere Optimierung der Kulturbedingungen und die Verwendung geeigneter Samenspender kann zu besseren Ergebnissen beitragen.

6. Summary

Selection of feline oocytes using brilliant cresyl blue test (BCB)

The aim of this study was to investigate the effect of oocyte selection via BCB test on the in vitro developmental competence of feline oocytes. In addition the influence of age of the donor cats on the cleavage or blastocyst rate of the oocytes was examined.

In the first part of this study, 1587 cumulus oocytes complexes (COC) collected from cat ovaries after elective ovarectomy were available. To examine the effect of incubation before in vitro maturation (IVM) 239 COCs were kept in DPBS containing 0,4% BSA at 38,5°C for 90 minutes before IVM (holding control). After IVM the oocytes were fertilized in vitro and cultured for 8 days. 682 freshly recovered COCs were stained for 90 minutes at 38,5°C with 26µM BCB diluted in DPBS + 0.4% BSA before IVM. After staining the oocytes were divided into BCB- (colorless cytoplasm) and BCB+ (blue-colored cytoplasm). After IVM the oocytes were fertilized in vitro and cultured for 8 days separately. 666 control COCs were subjected to IVM and subsequently fertilized and cultured for 8 days. The percentage of BCB+ oocytes was 54.3%. The cleavage rate on day 3 in BCB+ oocytes was significantly higher than the cleavage rate of the BCB- oocytes (44.1% vs 18.9%). Oocytes of the control group had a cleavage rate of 32.7% and oocytes of the holding control group showed a cleavage rate of 34.3%. This was significantly higher than the cleavage rate of the BCB- oocytes. The blastocyst rate was significantly higher in BCB+ oocytes (11.4%) compared with the BCB- group (5.8%). There was no significant difference between the blastocyst rate of the control group (12.2%) and the rate of the holding control group (13.0%). A comparison of the blastocyst rate based on cleaved oocytes showed a significant difference between BCB+ oocytes (25.8%) and control group (37.2%).

For the second part of this study, only donor cats with known age at the day of ovarectomy were used. Group 1 included prepuberal donor cats (less than 9 month, 138 COC). The second group consisted of donor cats aged from 10 to 24 month (n= 57). Donor cats older than 2 years were allocated to group 3 (n=63).

258 COCs were evaluated by morphological standards after collection and divided into 3 classes. In group 1 (prepuberal cats) the percentage of COCs in class III (few cumulus cells, heterogenous cytoplasm) was 73.2%. This was significantly higher than the corresponding values in groups 2 and 3 (45.6% and 54.0%, respectively).

In group 1 the highest cleavage rate (48.1%) was obtained (prepuberal cats) with oocytes of class II. In group 2 (adult cats < 2 years) there were no significant differences concerning the cleavage rate in the different COC classes. Within Group 3 (> 2 years) class I oocytes showed a cleavage rate of 84.6% which was significantly higher when compared to class III oocytes (35.3%).

The blastocyst rate based on the total number of COC ranged from 0% to 25% whereas the blastocyst rate based on cleavage rate ranged from 0% to 50%. Because of the small number of blastocysts obtained no significant differences between the groups or COC classes could be detected.

This study indicates that the BCB test may be a useful method to select developmentally competent feline oocytes for in vitro production. The use of adult donor cats, optimized culture conditions and the use of semen donors with known fertility could help to improve the results.

8. Anhang

8.1. Verwendete Medien und Färbelösungen

Die bei den Versuchen verwendeten Medien wurden nach einem modifizierten Protokoll von FREISTEDT et al. (2001a) hergestellt

1. Transportmedium für Ovarien

1000 ml Phosphatgepufferte Salzlösung nach DULBECCO (PBS)
(Fa. Biochrom, Berlin)

100 ml Penicillin G (P 3032, Fa. Sigma, Taufkirchen)

100 ml Steptomycin Sulfat (S 6501, Fa. Sigma, Taufkirchen)

2. Aufbewahrungs-, Slicing- und Basislösung für die BCB-Färbung (Modifizierte PBS-Lösung)

500 ml Phosphatgepufferte Salzlösung nach DULBECCO (PBS)
(Fa. Biochrom, Berlin)

500 mg Glucose (Fa. Merck, Darmstadt)

18 mg Na-Pyruvat (P4562, Fa. Sigma, Taufkirchen)

10 mg Penicillin G (P3032, Fa. Sigma, Taufkirchen)

20 mg Steptomycin Sulfat (S 6501 Fa. Sigma, Taufkirchen)

5,6 mg Heparin (H3149, Fa. Sigma, Taufkirchen)

150 mg Bovines Serumalbumin (BSA) (A9647, Fa. Sigma, Taufkirchen)

Die Lösung wurde im Kühlschrank im Labor aufbewahrt und in sterilen 50ml-Röhrchen (Fa. VWR, Darmstadt) in den Tierarztpraxen für die Aufbewahrung der Ovarien bis zur Abholung gelagert.

3. Stammlösung für das Reifungsmedium (TCM Stock)

100ml Aqua ad injectabile (Fa. Baxter)

1500mg Medium 199 Hepes Modification (M2520, Fa. Sigma, Taufkirchen)

300mg NaHCO₃ (S 3632, Fa. Sigma, Taufkirchen)

5mg Gentamicin Sulfat (G 3632, Fa. Sigma, Taufkirchen)

2,5 mg Natriumpyruvat (P 4562, Fa. Sigma, Taufkirchen)

Es wurde ein pH-Wert von 7,4 eingestellt und das Medium wurde mit einem Spritzenvorsatzfilter (Porengröße: 0.22µm, Fa. VWR Darmstadt) sterilfiltriert. Die Stammlösung wurde im Kühlschrank bis maximal 4 Wochen aufbewahrt.

Reifungsmedium

Das Medium wurde am Tag vor der Verwendung hergestellt und vor der Verwendung im Brutschrank äquilibriert. Danach wurde es mit einem Spritzenvorsatzfilter (Porengröße 0,2 µm, Fa. VWR, Darmstadt) sterilfiltriert, und je 500µl in eine 4-Well-Schale (Nunc-Multischalen, Fa. VWR, Darmstadt) pipettiert.

20 ml TCM Stock

12 mg Calciumlaktat

5 mg Na-Pyruvat

2 mg Cystein

60 mg BSA

2 µl Pluset[®] (0,1 IU FSH/LH)

4. Stammlösung für das Befruchtungs- und Swim-up-Medium (TL Stock)

250 ml Aqua ad injectabila(Fa. Baxter)

522,5 mg NaH₂PO₄ (A 957546, Fa. Merk, Darmstadt)

75 mg CaCl₂ x 2H₂O (C 3881, Fa. Sigma, Taufkirchen)

595 mg Medium 199 Hepes Modification (M2520, Fa. Sigma, Taufkirchen)

1450 mg NaCl (S 5886, Fa. Sigma, Taufkirchen)

57,5 mg KCL (26868, Fa. Merk, Darmstadt)

9 mg NaH₂PO₄ (A 957546, Fa. Merk Darmstadt)

920µl Natriumlaktat-Sirup (L 1375, Fa. Sigma, Taufkirchen)

25mg MgCl₂ x 6 H₂O (M0250, Fa. Sigma, Taufkirchen)

2,5 mg Phenolrot (P 5530, Fa. Sigma, Taufkirchen)

Swim up-Medium

10 ml TL – Stammlösung

60 mg BSA (Fa. Sigma, Taufkirchen)

2,2 mg Natriumpyruvat (P4562, Fa. Sigma, Taufkirchen)

Das Medium wurde am Tag der Verwendung hergestellt und vor der Verwendung mindestens drei Stunden im Brutschrank äquilibriert. Danach wurde je 1 ml mit einem Spritzenvorstanzfilter (Porengröße 0,2µm, Fa. VWR, Darmstadt) steril, in sterile 5 ml-Röhrchen (Fa. VWR, Darmstadt) filtriert.

Befruchtungsmedium

Am Abend vor der Verwendung wurde das Befruchtungsmedium mit folgenden Substanzen vorbereitet:

10 ml TL-Stock

60 mg BSA (Fa. Sigma, Taufkirchen)

2,2 mg Na-Pyruvat (Fa. Sigma, Taufkirchen)

am Tag der Verwendung

+ 100µl Heparin Stammlösung

+ 100µl Gentamycin Stammlösung

Wurden in eine mittlere Petrischale mit großem Filter (Fa. VWR, Darmstadt) sterilfiltriert und im Brutschrank bis zur Verwendung gelagert.

5. SOF-Stammlösung

100 ml Aqua ad injectabila (Fa. Baxter)
629,2 mg NaCl (S 5886, Fa. Sigma, Taufkirchen)
53,4 mg KCL (Fa. Merck, Darmstadt)
16,2 mg KH₂PO₄ (Fa. Merck, Darmstadt)
210,6 mg NaHCO₃ (S 5761, Fa. Sigma, Taufkirchen)
50 µl Phenolrot-Lösung (Fa. Gibco, Schottland)
500 µl L-Glutamin (G 6392, Fa. Sigma, Taufkirchen)
47,0 µl Natriumlaktat-Sirup (L 1375, Fa. Sigma, Taufkirchen)
24,8 mg CaCl₂ x 2H₂O (C3881, Fa. Sigma, Taufkirchen)
9,6 mg MgCl₂ x 6H₂O (M 0250, Fa. Sigma, Taufkirchen)

Das Medium wurde auf einen pH-Wert von 7,2-7,3 eingestellt und mit einem Spritzenvorsatzfilter (Porengröße 0,2µm, Fa. VWR, Darmstadt) sterilfiltriert. Im Kühlschrank wurde die Stammlösung maximal 4 Wochen lang aufbewahrt.

Kulturmedium (Tag 1)

10 ml SOF-Stammlösung
3,6 mg Natriumpyruvat (P 4562, Fa. Sigma, Taufkirchen)
100 µl BME (essentielle Aminosäuren, B6766, Fa. Sigma, Taufkirchen)
50µl MEM (nicht-essentielle Aminosäuren, M 7145, Fa. Sigma, Taufkirchen)
1 ml ECS (Östrisches Kuhserum)
40mg BSA (Fa. Sigma, Steinheim)

Das Medium wurde am Tag vor der Verwendung hergestellt und vor der Verwendung im Brutschrank äquilibriert. Danach wurde es mit einem Rotrandfilter (Porengröße 0,2µm, Fa. VWR, Darmstadt) sterilfiltriert, und je 400µl in eine 4-Well-Schale (Nunc-Multischalen, Fa. VWR, Darmstadt) pipettiert.

Kulturmedium (Tag 4)

10 ml SOF-Stammlösung

3,6 mg Natriumpyruvat (P 4562, Fa. Sigma, Taufkirchen)

100 µl BME (essentielle Aminosäuren, B6766, Fa. Sigma, Taufkirchen)

50µl MEM (nicht-essentielle Aminosäuren, M 7145, Fa. Sigma, Taufkirchen)

0,5 ml ECS (Östrisches Kuhserum)

9,9 mg Glucose (G 6152, Fa. Merk, Darmstadt)

Das Medium wurde am Tag vor der Verwendung hergestellt und vor der Verwendung im Brutschrank äquilibriert. Danach wurde es mit einem Rotrandfilter (Porengröße 0,2 µm, Fa. VWR, Darmstadt) sterilfiltriert, und je 400µl in eine 4-Well-Schale (Nunc-Multischalen, Fa. VWR, Darmstadt) pipettiert.

6. BCB-Stammlösung

1 mg BCB in 10ml PBS + 04% BSA

Arbeitslösung

100µl BCB-Stammlösung

880µl PBS + 4% BSA

8.2. Medienzusätze

1. Pluset FSH – LH 1/1 (Fa. Calier S.A. Barcelona, Spanien)

gebrauchsfertige Lösung, Lagerung bei -20°C in Portionen à 10 µl

2. ECS

Zur Gewinnung von ECS wurde von brünstigen Kühen je 1l Blut in sterile 50ml-Röhrchen (Fa. VWR, Darmstadt) ohne Zusatz von Gerinnungshemmern abgefüllt und bis zur Gerinnung ca. 1 Stunde stehen gelassen. Anschließend wurde das Blut 20 Min bei 600g zentrifugiert und das Serum in sterile 50 ml-Röhrchen abpipettiert. Nach einer zweiten Zentrifugation (10 Min, 600g) wurde das Serum in einem Becherglas gepoolt und zur Inaktivierung des Komplementsystems 30 min in einem auf 56° C erwärmten Wasserbad inkubiert. Danach wurde es in Eppendorf-Cubs á 1ml bei -20° C eingefroren.

3. Heparinstock

5 ml Aqua ad injectabila (Fa. Baxter, Unterschleissheim)

5 mg Heparin (Fa. Sigma, Steinheim)

Die fertige Lösung wurde sterilfiltriert und in Tubes (Fa. Eppendorf, Hamburg) a 100µl abgefüllt und anschließend eingefroren.

4. Gentamycinstock

5ml Aqua ad injectabila (Fa. Baxter, Unterschleissheim)

5 mg Gentamicin-Sulfat (Fa. Sigma, Steinheim)

Die fertige Lösung wurde sterilfiltriert und in Tubes (Fa. Eppendorf, Hamburg) a 100µl abgefüllt und anschließend eingefroren.

9. Literaturverzeichnis

Alm A., Torner H., Lörke T., Viergutz T., Ghoneim IM., Kanitz W., (2005). *Bovine blastocyst development rate in vitro is influenced by selection of oocytes by brilliant cresyl blue staining before IVM as indicator for glucose-6-phosphat dehydrogenase activity.* Theriogenology **63**: 2194-2205

Arias-Alvarez M., García-García R., Torres-Rovira L., González-Bulnes A., Rebollar PG. and Lorenzo PL. (2009). *Influence of leptin on in vitro maturation and steroidogenetic secretion of cumulus-oocyte complexes through Jak2/STAT3 and MEK 1/2 pathways in the rabbit model.* Reproduction PMID 20032210

Armstrong D.T., Xia P., de Gannes G., Tekpetey F.R. and Khamsi F. (1996). *Differential effects of insulin-like growth factor-I and follicle-stimulating hormone on proliferation and differentiation of bovine cumulus cells and granulosa cells.* Biol. Reprod. **54**: 331-338

Bavister, B. D. and Squirrell, J. M. (2000). *Mitochondrial distribution and function in oocytes and early embryos.* Hum. Reprod. **15**: 189-198

Bhojwani S., Alm H., Torner H., Kanitz W., Poehland R. (2007). *Selection of developmentally competent oocytes through brilliant cresyl blue stain enhances blastocyst development rate after bovine nuclear transfer.* Theriogenology **67**: 341-5

Bogliolo L., Leoni G., Ledda S., Naitana S., Zedda M., Carluccio A., and Pau S. (2001). *Intracytoplasmatic sperm injection of in vitro matured oocytes of domestic cats with frozen-thawed epididymal spermatozoa.* Theriogenology **56**(5): 955-67

Bols P.E.J., Goovaerts I.G.F., Leroy J.L.M.R. (2007). *From retrieval to blastozyst culture: following the individual oocyte.* Gamete Research 23 annual meeting A.E.T.E. Alghero

Bristol-Gould S. and Woodruff TK. (2006). *Folliculogenesis in the domestic cat (Felis catus).* Theriogenology **66**(1): 5-13

Buccione R., Schoeder A.C. and Eppig J.J. (1990). *Interactions between somatic cells and germ cells throughout mammalian oogenesis.* Biol. Reprod. **43**: 543-547

Carabatsos M.J., Sellitto C., Goodenough D.A. and Albertini D.F. (2000). *Oocyte-granulosa cell heterologous gap junctions are required for the coordination of nuclear and cytoplasmatic meiotic competence.* Dev. Biol. **226**: 167-179

Ciani F., Cocchia N., Rizzo M., Ponzio P., Tortora G., Avallone L., Lorizio R., (2008). *sex determining of cat embryo and some feline species.* Zygote **16** 169-177

Comizzoli P, Wildt, D.E., Pukazhenthi B.S. (2006). *In vitro development of cat embryos following intra-cytoplasmatic sperm injection with testicular spermatozoa.* Theriogenology **66**: 1659-1663

Comizzoli P., Wildt D.E. und Pukazhenthi B.S. (2003). *Overcoming poor in vitro nuclear maturation and developmental competence of domestic cat oocytes during the non-breeding season.* Reproduction **126**(6): 809-16

Coskun S., Uzumcu M., Lin YC., Friedmann CI. and Alak BM. (1995). *Regulation of cumulus cells steroidogenesis by the porcine oocyte and preliminary characterization of oocyte-produced factor(s).* Biol. Reprod. **53**: 670-5

De Matos D.G., Gasparrini, B., Pasqualini, S.R. and Tompson , J.G. (2002): *Effect of glutathione synthesis stimulation during in vitro maturation of ovine oocytes on embryo development and intracellular peroxide content.* Theriogenology **57**: 1443-1451

De Schepper GG., van Noorden CJ., Houtkooper JM.,(1987) *Age-related change of glucose-6-phosphate dehydrogenase activity in mouse oocytes.* Histochem. **19**: 467-70

De Witt A.A.C., und Kruip T,A.M. (2001). *Bovine cumulus-oocyte-complex quality is reflected in sensitivity for alpha-amanitin, oocyte diameter and developmental capacity.* Anim. Reprod. Sci. **65**: 51-65

Egerszegi I., Alm H., Rátky J., Heleil B., Brüssow KP and Torner H. (2010). *Meiotic progression, mitochondrial features and fertilization characteristics of porcine oocytes with different G6PDH activities.* Reprod. Fertil Dev. **22**(5): 830-8

Eppig J.J. (1993). Regulation of mammalian oocyte maturation
In: Adashi, Leung; The ovary; Raven Press, Ltd., New York

Ericson S.A., Boice, M.L., Funahashi H., and Day, B.N., (1993). *Assessment of porcine oocytes using brilliant cresyl blue.* Therogenology **39**: 214-18

Fair T., Hyttel, P., Greve. T. (1995b). *Bovine oocyte diameter in relation to maturational and transcriptional activity.* Mol. Repr. Dev. **42**: 422-437

Farstad W. (2000). *Current state in biotechnology in canine and feline reproduction.* Animal Reproduction Science **60-6**: 375-387

Feldmann and Nelson (1996). *Canine and feline endocrinology and reproduction.* Third edition Saunders

Freistedt P., Stojkovic, P., Wolf, E. and Stojkovic M., (2001). *Energy status of nonmatured and In vitro-matured domestic cat oocytes and of different stages of in vitro-produced embryos: enzymatic removal of the zona pellucida increases adenosine triphosphate content and total cell number of blastocysts.* Biology of Reproduction **65**: 793-798

Freistedt P., Stojkovic M. und Wolf E. (2001a). Efficient *in vitro* production of cat embryos in modified synthetic oviduct fluid medium: effects of season and ovarian status. Biol Reprod **65**(1): 9-13

Freistedt P., Stojkovic B., Bonhoeffer T., Braun J. and Wolf E. (1999). *In vitro* production of domestic cat embryos using modified IVP bovine system. Theriogenology **51**: 285 (abstr.)

Gomez M.C., Pope C. E., Harris R., Mikota S. and Dresser B.L. (2003). *Development of in vitro matured, in vitro fertilized domestic cat embryos following cryopreservation, culture and transfer.* Theriogenology **60**(2): 239-51

Gomez M.C., Pope C.E., Harris R., Davis A., Mikota S. and Dresser B.L. (2000) *Birth of kittens produced by intracytoplasmatic sperm injection of domestic cat oocytes matured in vitro.* Reprod. Fertil. Dev. **12**: 423-433

Goodrowe K.L., Howard J.G, Schmidt P.M.; Wildt D.E. (1998). *Reproductive biology of the domestic cat with special reference to endocrinology, sperm function and in vitro fertilisation.* J. Reprod. Fertil. **39**: 73-90

Gordon, I. (2003). *Laboratory Production of Cattle Embryos*, 2. Auflage, CABI Publischung

Hay M. A. and Goodrowe K.L. (1993). *Comparative cryopreservation and capacitation of spermatozoa from epididymides and vas deferentia of the domestic cat.* J. Reprod. Fertil. Suppl. **47**: 1101-9

Herrick J.R., Campbell M., Levens G., Moore T., Benson K., D'Agostino J.G. West G., Okeson D.M., Coke R., Portacio S.C., Leiske K., Kreidler C., Polumbo P.J. and Swanson W.F. (2009). *In vitro fertilisation and sperm cryoconservation in the black-footed cat (*Felis nigripes*) and sand cat (*Felis margarita*).* Biol. Reprod. **109.081034**

Herrick J.R. and Swanson W.F., (2003). *Gonadotropin exposure, salt storage and storage duration affect penetration of domestic cat oocytes by homologous spermatozoa.* Theriogenology **59**(7): 1503-13

Hoffert K.A., Anderson G.B., Wildt D.E. and Roth T.L. (1997). *Transition from maternal to embryonic control of development in IVM/IVF domestic cat embryos.* Mol. Reprod. And Development. **48** : 208-215

Host E., Mikkelsen, A. L., Lindberg, S., and Smidt-Jensen, S. (2000). *Apoptosis in human cumulus cells in relation to maturation stage and cleavage of corresponding oocyte.* Acta Obstet Gynecol Scand. **79**(11): 936-940

Hunter, M. G., Brankin, V., Quinn, R. L., Ferguson, E. M., Edwards, S. A., and Ashworth, C. J. (2005). *Oocyte-somatic cell-endocrine interactions in pigs.* Domest. Anim. Endocrinol. **29**: 371-384

Hyttel P., Fair T., Callesen H. and Greve T. (1997). *Oozyte growth, capacitation and final maturation cattle.* Theriogenology **47**: 23-32

Ishizaki, C., Watanabe H., Bhuiyan M.M.U., Fukui Y. (2009). *Developmental competence of porcine oocytes selected by brilliant cresyl blue and matured individually in a chemically defined culture medium.* Theriogenology **72**(1): 72-80

Iwamatsu, T., Yanagimachi, R. (1975). *Maturation in vitro of ovarian oocytes of prepuberal and adult hamsters.* J. Reprod. Fertil. **45**: 83-90

Johnston L.A., Donoghue A.M., O`brien S.J. and Wildt D.E. (1991a). *Culture medium and protein supplementation influence in vitro fertilisation and embryo development in the domestic cat.* J. Exp. Zool. **257**: 350-9

Johnston L.A., Donoghue A.M., O`brien S.J. and Wildt D.E. (1991b). *Influence of temperature and gas atmosphere on in-vitro fertilization and embryo development in domestic cats.* J. Reprod. Fertil. **92**(2): 377-82

Johnston LA, O'Brien SJ and Wild DE (1989). *In vitro maturation and fertilisation of domestic cat follicular oocytes.* Gamete Research **24**: 343-356

Joo J-K., Joo B-S., Kim S-C., Choi J-R., Park S-H., Lee K-S. (2010). *Role of leptin in improvement of oocyte quality by regulation of ovarian angiogenesis.* Anim. Reprod. Fert. **119**(3-4): 329-34

Kanitz, W., Brüssow, K.-P., Becker, F., Torner, H., Schneider, F., Kubelka, M. and Tomek, W. (2001). *Comparative aspects of follicular development, follicular and oocyte maturation and ovulation in cattle and pigs.* Archives of Animal Breeding **44**: 9-23

Karja N.W., Otoi T., Murakami M., Fahrudin M. and Suzuki T. (2002). *In vitro maturation, fertilisation and development of domestic cat oocytes recovered from ovaries collected at three stages of the reproductive cycle.* Theriogenology **57**(9): 2289-98

Karja N.W., Otoi T., Murakami M., Yuge M., and Fahrudin M. (2002a). *Effect of protein supplementation on development to the hatching and hatched blastocyst stages of cat embryos.* Reprod. Fert. Dev. **14**(5-6): 291-6

Karlsson C., Lindell K., Svensson E., Bergh C., Lind P., Billig H., Carlsson L.M., and Carlsson B., (1997). *Expression of functional leptin receptors in the human ovary.* J. Clin. Endocrinol. Metab. **82** 4144-4148

Katska-Ksiazkiewicz L., Opiela J. and Rynska B. (2007). *Effects of oocyte quality, semen donor and embryo co-culture system on the efficiency of blastocysts production in goats.* Theriogenology **68**(5): 736-44

Katska-Ksiazkiewicz L., Rynska B., Kania G., Smorag Z. Gajda B, und Pienkowski M. (2003). *Timing of nuclear maturation of nonstored and stored domestic cat oocytes.* Theriogenology **59**(7): 1567-74

Khatir H., Lonergan P., Touzé J.-I. and Mermilliod P. (1998). *The characterization of bovine embryos obtained from prepubertal calf oocytes and their viability after non chirurgical embryo transfer.* Theriogenology **50**: 1201-10

Kityanant Y., Saikhun J. Und Pavasuthipaisit K. (2003). *Somatic cell nuclear transfer in domestic cat oocytes treated with IGF-I for in vitro maturation.* Theriogenology **59**(8): 1775-1786

Larsen W.J., Chen L., Powers R., Zhang H., Russell P.T., Chambers C., Hess K., and Flick R. (1996). *Cumulus expansion initiates physical and developmental autonomy of the oocyte.* Zygote **4**: 335-341

Lasiene K., Vitkus A., Valanciute A., Lasys V. (2009). *Morphological criteria of oocyte quality.* Medicina (Kaunas) **45**(7): 509-15

Laufer N., Decherney A.H., Haseltine F.P. und Behrmann H.R. (1984). *Steroid secretion by the human egg-corona-cumulus complex in culture.* J Clin Endocrinol Metab **58**(6): 558-62

Lee K. S., Joo, B. S., Na, Y.J., Yoon, M. S., Choi, O.H., and Kim, W.W. (2001): *Cumulus cells apoptosis as an indicator to predict the quality of oocytes and the outcome of IVF-ET.* J. Assist. Reprod. Genet. **18**(9): 490-98

Lopes, M.D., Uiechi, E. and Trinca, L.A. (2004). *In vitro evaluation of oocyte nuclear maturation in young and old domestic cats (Felis catus).* Braz. J. Vet. Res. Anim. Sci. vo. 41, n.4, pp 268-273. ISSN 1413-9596, doi: 10.1590/S1413-95962004000400008

Luvoni G.C., Chigioni S., Perego L., Lodde V., Modina S., Luciano A.M. (2006). *Effect of gonadotropin during in vitro maturation of feline oocytes an oocyte-cumulus cells functional coupling in and intracellular concentration of glutathione.* Theriogenology **96**: 66-78

Luvoni G.C. and Chigioni S. (2006). *Culture strategies for maturation of carnivore oocytes.* Theriogenology **66**: 1471-1475

Luvoni G.C. and Pellizzari P. (2000). *Embryo development in vitro of cat oocytes cryoconserved at different maturation stages.* Theriogenology **53**(8): 1529-40

Luvoni G.C. and Oliva O. (1993). *Effect of Medium-199 and fetal calf serum on in vitro maturation of domestic cat oocytes.* J. Reprod. Fert. **47** 203-207

Mangia F, Epstein CJ. (1975). *Biochemical studies of growing mouse oocytes preparation of oocytes and analysis of glucose-6-phosphate dehydrogenase and lactat dehydrogenase activities.* Dev Biol **45**: 211-20

Manjuhanta BM., Gupta PS., Devaraj M., Ravindra JP., Nandi S. (2007). *Selection of developmentally competent buffalo oocytes by brilliant cresyl blue staining before IVM.* Theriogenology **68**: 1299-130

Martins L.R., Ferandes CB., Minto BW., Landim-Alverenga FC. and Lopes MD : (2009). *Ultrastructural characteristics of non-matured and in vitro matured oocytes collected from pre-pubertal and adult domestic cat ovaries.* Reprod. Domest. Anim. **44**(2): 251-4

Mattioli M., Galeati G., Bacci ML. and Seren E.(1998). *Follicular factors influence oocyte fertilizability by modulating the intercellular cooperation between cumulus cells and oocyte.* Gamete Res. **21**: 223-32

Mayes MA. and Sirard MA. (2002). *Effect of type 3 and type 4 phosphodiesterase inhibitors on the maintenance of bovine oocytes in meiotic arrest.* Biol. Reprod. **66**: 180-184

Mc Kenzie L.J., Pangas S.A., Carson S.A., Kovanci E., Cisneros P., Buster J.E. Amato P. and Matzuk M.M. (2004). *Human cumulus granulosa cell gene Expression: a predictor of fertilization and embryo selection in women undergoing.* Hum. Reprod. **19**: 2869-2874

Merlo B., Iacono E., Regazzini M., Zambelli D. (2008). *Cat blastocysts produced in vitro from oocytes vitrified using the cryoloop technique and cryopreserved electroejaculated semen.* Theriogenology **70**: 126-130

Mlodawska W., Pawlowska A., Kochan J. (2005). *Meiotic competence of mare oocytes selected by using brilliant cresyl blue test.* In Alm H., Torner H., Wade JF(es) Proceedings IEHG. Kühungsborn, Germany, pp 18-21

Motlik J., Fulka J. und Flechon J.E. (1986). *Changes in intercellular coupling between pig oocytes and cumulus cells during maturation in vivo and in vitro.* J. Reprod. Fertil. **76**(1): 31-7

Motlik J. and Fulka J. (1976). *Breakdown of the germinal vesicle in pig oocytes in vivo and in vitro.* J. Exp. Zool. **198**: 155-162

Murakami M., Otoi T., Karja N.W., Wongsrikeao P., Agung B. and Suzuki T. (2004). *Blastocysts derived from in vitro-fertilized cat oocytes after vitrification and dilution with sucrose.* Cryobiology **48**(3): 341-8

Murakami M., Otoi T., Karja N.W., Ooka A. and Suzuki T. (2002). *Effects of serum -free culture media on in vitro development of domestic cat embryos following in vitro maturation and fertilization.* Reprod Domest Anim **37**(6): 352-6

Nagano M., Uchikura, K., Takahshi, Y. and Hishinuma, M. (2008). *Effect of duration of in vitro maturation on nuclear maturation and fertilizability of feline oocytes.* Theriogenology **69**(2): 231-6

Nogueira D., Ron-El R., Friedler S., Schachter M., Raziel A., Cortvrindt R. and Smitz J. (2006). *Meiotic arrest in vitro by phosphodiesterase 3-inhibitor enhances maturation capacity of human oocytes and allows subsequent embryonic development.* Biol. Reprod. **74**: 177-184

Nogueira D., Albano C., Adriaenssens T., Cortvrindt R., Bourgain C., Devroey P. and Smitz J. (2003). *Human oocytes reversibly arrested in prophase I by Phosphodiesterase type 3 inhibitor in vitro*. *Biol. Reprod.* **69**: 1042-1052

O'Brien Jk., Dwarte D., Ryan JP., Maxwell MC., and Evans G. (1996). *Developmental capacity energy metabolism and ultrastructure of mature oocytes from prepubertal and adult sheep*. *Reprod. Fertil. Dev.* **8**:1029-37

Opiela J., Katska-Ksiazkiewicz L., Lipinski D., Slomski R., Bzowska M. and Rynska B. (2008). *Interactions among activity of glucose-6-phosphate dehydrogenase in immature oocytes, expression of apoptosis related genes Bcl-2 and Bax and developmental competence following IVP in cattle*. *Theriogenology* **69**: 546-555

Otzdorff C. (2006). *Untersuchungen zur Aggregation und Aktivität von Mitochondrien im Ooplasma von Cumulus-Oozyten-Komplexen des Rindes während der In-vitro-Reifung*. *Inaugural-Diss.* FU Berlin Journal-Nr.: 3084

Parrish J.J., Susko-Parrish, J.L., Leibfried-Rutledge M.L., Critser E.S., Eyestone W.H. and First N.L. (1986). *Bovine in vitro fertilisation with frozen-thawed semen*. *Theriogenology* **25**: 591-600

Pope C.E., Crichton EG., Gomez MC., Dumas C. and Dresser BL. (2009). *Birth of cat kittens of predetermined sex after transfer of embryos produced by in vitro fertilization of oocytes with flow-sorted sperm*. *Theriogenology* **71**(5): 864-71

Pope C.E., Gomez M.C., Dresser B.L. (2006). *In vitro production and transfer of cat embryos in the 21th century*. *Theriogenology* **66**(1): 59-71

Pope C.E., Schmid R., and Dresser B. L. (1999). *In vitro development of cat embryos produced by in vitro fertilisation is enhanced by addition of cysteine to the maturation medium and a reduced O₂ atmosphere*. *Theriogenology* **51**(1): 291

Pope C.E., Mc Rae M.A., Plair B.L., Keller G.L. and Dresser B.L. (1997). *In vitro and in vivo development of embryos produced by in vitro maturation and in vitro fertilization of cat oocytes*. *J. Reprod. Fertil.* **51**: 69-82

Pujol M., López-Béjar M., Paramio MT.(2004) *Developmental competence of heifer oocytes selected using the brilliant cresyl blue(BCB) test*. *Theriogenolgy* **61** :735-44

Pujol M., López-Béjar M., Mertens MJ, Rodriguez- Gonzales E., Velilla E., Paramio M. T. (2000). *Selection of immature oocytes using the brilliant cresyl blue test*. *Theriogenology* **53** : 466 (abstr.)

Revel F., Mermilliod P., Peynot N., Renard JP. and Heyman Y. (1995). *Low developmental capacity of in vitro matured and fertilized oocytes from calves compared with that of cows*. *J. Reprod. Fertil.* **103**: 115-20

Roca J., Martinez E., Vazquez JM., Lucas X. (1998), *Selection of immature pig oocytes for homologous in vitro penetration assays with the brilliant cresyl blue test.* Reprod Fertil Dev **10**:479-85

Rodrigues BA., Rodrigues P., Silva AEF., Cavalcante LF., Feltrin C. and Rodrigues JI. (2009). *Preliminary study in immature canine oocytes stained with brilliant cresyl blue and obtained from bitches with low and high progesterone serum profiles.* Reprod. Dom. Anim. **44**: (2) 255-258

Rodriguez- Gonzales E., Lopez-Bejar M., Izquierdo D., Paramio MT. (2003). *Developmental competence of prepubertal goat oocytes selected with brilliant cresyl blue and matured with cysteamine supplementation.* Reprod Nutr Dev **43**:179-87

Rodriguez-Gonzales E., Lopez-Bejar M., Velilla E., Paramino MT. (2002). *Selection of prepubertal goat oocytes using the brilliant cresyl blue test.* Theriogenology **57**: 1397-409

Rüsse I., Sinowitz F. (1991) *Lehrbuch der Embryologie der Haustiere.* Parey

Saito H., Saito, T., Kaneko, T., Sasagawa, I., Kuramato, T., and Hiroi, M. (2000). *Relatively poor oocyte quality is an indication for intracytoplasmatic sperm injection.* Fertil. Steril. **73**, 465-469

Shille V.M., Lundström K. E. Stabenfeldt G.H. (1979). *Follicular function in domestic cat as determined by estradiol-17 β concentrations in plasma: relation to estrus behavior and cornification of exfoliated vaginal epithelium.* Biology of Reprod. **21**, 953-963

Silva CC. and Knight PG. (2000). *Effects of androgens, progesterone and their antagonists on the developmental competence of in vitro matured bovine oocytes.* J. Reprod. Fertil. **119**(2): 261-9

Simpson G., England, G., Harey M. (1998). *Manual of Small Animal Reproduction and Neonatology.* British Small Animal Veterinary Association Cheltenham, United Kingdom

Singh B., Meng L., Rutledge JM. and Armstrong DT. (1997). *Effects of epidermal growth factor and follicle-stimulating hormone during in vitro maturation on cytoplasmatic maturation of porcine oocytes.* Mol. Reprod. Dev. **46**: 401-7

Sirard M.A., Richard, F., Blondin, P. and Robert, C. (2006). *Contribution of the oocytes to embryo quality.* Theriogenology **65**: 126-136

Sirotkin A. V., Rafay, J., Kotwicia J., (2009) *Leptin controls rabbit ovarian function in vivo and in vitro: Possible interrelationships with ghrelin.* Theriogenology **72**: 198-202

Sojka NJ., Jenings, LL., Hammer CE. (1970). *Artificial insemination in the cat.* Lab. Anim. Care **20**: 198-204

Sorensen, R.A., Wassarman, P.M. (1976). *Relationship between growth and meiotic maturation of the mouse oocyte.* Dev. Biol. **50**:531-536

Spindler R. E., Wildt D.E. (2002). *Quality an age of companion felid embryos modulate enhanced development by group culture.* Biology of Reproduction **66**: 167-173

Spindler R.E., Pukazhenti B.S., and Wildt D.E. (2000). *Oocyte metabolism predicts the development of cat embryos to blastocysts in vitro.* Molecular Reprod. and Dev. **56**: 163-171

Spindler R.E. and Wildt D.E. (1999). *Circannual variations in intraovarian oocyte but not epididymal sperm quality in the domestic cat.* Biol. Reprod. **61**(1): 167-73

Swanson W.F., Mc Rae M.A., Wildt D.E. and Rall W.F. (1999). *Cryoprotectant toxicity and cryopreservation success in IVF derived in domestic cat embryos after embryo transfer.* Theriogenology **51**: 174 (abstr.)

Swanson W.F., Roth T.L. and Godke R.A. (1996). *Persistence of the developmental block of in vitro fertilized domestic cat embryos to temporal variations in culture conditions.* Mol. Reprod. Dev. **43**(3): 298-305

Sun, Q. Y., Wu, G. M., Lai, L., Park, K. W., Cabot, R., Cheong, H. T., Day, B. N., Prather, R. S. and Schatten, H. (2001). *Translocation of active mitochondria during pig oocyte maturation, fertilization and early embryo.* In vitro Reproduction **122**: 155-163

Szybek, K. (1972). *In-vitro maturation of oocytes from sexually immature mice.* J. Endocrinol. **54**: 527-528

Tagawa M., Matoba M., Okada M., Metoki K. and Imai K. (2007). *Developmental competence of oocytes selected by the brilliant cresyl blue staining in prepubertal and adult cattle.* Reprod. , Fert and Dev. **19**(1): 273-274

Tebet, J.M., Martins, M.I.M., Chirinea, V.H., Souza, F.F., Campagnol, D., Lopes, M.D. (2006). *Cryoconservation effects on domestic cat epididymal versus electro-ejaculated spermatozoa.* Theriogenology **66**: 1629-1632

Tiffin GJ., Rieger D., Betteridge K.J., Yadav BR. and King WA. (1991). *Glucose and glutamine metabolism in pre-attachment cattle embryos in relation to sex and stage of development.* J. Reproduction Fert. **93**: 125-32

Torner H., Ghanem N., Ambros C., Hölker M., Tomek W., Phatsara C., Alm H., Sirard M-A., Kanitz W., Schellader K. (2008) *Molecular and subcellular characterisation of oocytes screened for their developmental competence based on glucose-6-phosphat dehydrogenase activity.* Reproduction **135**: 197-212

Tsafriri A., Chun SY., Zhang R., Hsueh AJ. and Conti M. (1996). *Oocyte maturation involves compartmentalization and opposing changes of cAMP levels in follicular somatic and germ cells: studies using selective phosphodiesterase inhibitors.* Dev. Biol. **178**: 393-402

Uchikura K., Nagano M. and Hishinuma M. (2010). *Evaluation of follicular and oocyte quality in pre-pubertal cats.* Reprod. Dom Anim doi 10.1111

Urdaneta A., Jiménez-Macedo A-R., Izquierdo D., Paramio M-T. (2003). *Supplementation with cysteamine during maturation and embryo culture on embryo development of prepubertal goat oocytes selected by the brilliant cresyl blue test.* Zygote **11**: 347-354.

Wang, Q., Sun, Q.Y. (2007). *Evaluation of oocyte quality: morphological, cellular and molecular predictors.* Reproduction, Fertility and Development **19**: 1-12

Wassarman M. (1988). *The mammalian ovum.* In: Knobil E., Neil D., Editors. The physiology of reproduction, vol 1., New York, USA: Raven Press; p. 69-102

Wildt D.E., Bush M., Howard JG., O'Brien SJ., Meltzer L., van Dyk A., Ebedes H., Brand DJ. (1983). *Unique seminal quality in the south african cheetah and a comparative evaluation in the domestic cat.* Biol. Reprod. **29**: 1019-1025

Wildt, D.E. (1991). *Fertilization in cats* a comparative overview of mammalian fertilization. O'Rand M. (Eds). New York, Plenum Press: 299-328

Wongsrikeao P., Otoi T., Yamasaki H., Agung B., Taniguchi M., Naoi H., Shimizu R., Nagai T. (2006). *Effects of single and double exposure to brilliant cresyl blue on the selection of porcine oocytes for in vitro production of embryos.* Theriogenology **66**: 366-372

Wolfe B.A., und Wildt D.E. (1996) *Development to blastocysts of domestic cat oocytes matured and fertilized in vitro after prolonged cold storage.* J. Reprod. Fertil **106**(1): 135-41

Wood TC., und Wildt D.E. (1997). *Effect of the quality of the cumulus-oocyte complex in the domestic cat on the ability of oocytes to mature, fertilize and develop into blastocysts in vitro.* J Reprod Fertil **110**(2): 355-60

Wood TC., Byers AP., Jennette BE. and Wildt D.E. (1995). *Influence of protein and hormone supplementation on in vitro maturation and fertilisation of domestic cat oocytes.* J. Reprod. Fertil. **104**: 315-323

Wu Y-G., Liu Y., Zhu P., Lan GC., Han D., Miao De-Q., Tan JH., (2007). *Selection of oocytes for in vitro maturation by brilliant cresyl blue staining: a study using the mouse model.* Cell Res **17**: 722-731

Xia P., Tekpetry FR., and Armstrong DT. (1994). *Effect of IGF-I on pig oocytes maturation, fertilisation and early embryonic development in vitro, and on granulosa and cumulus cell biosynthetic activity.* Mol. Reprod. Dev. **38**(4): 373-9

Yoshida M., Ishigaki K., and Pursel V.G. (1993). *Glutathione concentration during maturation and after fertilisation in pig oocytes: relevance to the ability of oocytes to form male pronucleus.* Biol Reprod **49**(1):89-94

Yuan, Y. Q., Van Soom, A., Leroy, J.L., Dewulf, J., Van Zeveren, A., de Kruif, A., and Peelman, L. J. (2005). *Apoptosis in cumulus cells, but not in oocytes may influence bovine embryonic developmental competence.* Theriogenology **63**: 2147-2163

Zeuner, A., Müller, K., Reguszynski, K., and Jewgenow, K. (2003). *Apoptosis within bovine follicular cells and its effect on the oocyte development during in vitro maturation.* Theriogenology **59**: 1421-1433

Zhang X. and Armstrong DT. (1989). *Effects of follicle-stimulating hormone and ovarian steroids during in vitro meiotic maturation on fertilization of rat oocytes.* Gamete Res. **23**: 267-77

Danksagung

Mein ganz besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. Joachim Braun für die Überlassung dieses interessanten Themas sowie die jederzeit gewährte freundliche Unterstützung bei der Planung, Durchführung, Anfertigung und Korrektur dieser Arbeit.

Dieser richtet sich auch besonders Frau Dr. Christiane Otzdorff, die mich mit unermüdlicher Geduld sowohl bei der Durchführung der Versuche als auch in allen anderen Bereichen dieser Arbeit unterstützt hat.

Bei den Mitarbeitern des Institutes, Frau Dr. Beate Walter, Frau Dr. Nina Brugger, Frau Heidi Wondra und Frau Elke Fink möchte ich mich auch für ihre jederzeit wie selbstverständlich gewährte Hilfe und vor allem für die Bereitstellung und Besorgung des Probematerials bedanken.

Mein herzlichster Dank gilt auch den Mitarbeitern des Tierheimes des Münchner Tierschutzvereines, den Tierarztpraxen, Dr. Michael Baumann, Dr. Karin Aumüller, Dr. Birgit Marx und Frau Dr. Katinka Gittner, ohne deren Bereitstellung des Probematerials diese Arbeit nicht möglich gewesen wäre.

Besonders bedanke ich mich bei meinem Mann, der mich stets mit viel Geduld bei den Korrekturen und bei der Gestaltung der Graphiken beraten hat.